



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE REGIÃO ENDÊMICA DE MALÁRIA DA
AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA: DESCRIÇÃO DE FREQUÊNCIAS
GÊNICAS E GENOTÍPICAS DOS LOCOS CCR5, ACP1 E DAS ENZIMAS DE
METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS GSTT1, GSTP1 E CYP2E1**

JOSILEIDE DUARTE DE FARIAS

Porto Velho – Rondônia

2012



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

JOSILEIDE DUARTE DE FARIAS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE REGIÃO ENDÊMICA DE MALÁRIA DA
AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA: DESCRIÇÃO DE FREQUÊNCIAS
GÊNICAS E GENOTÍPICAS DOS LOCOS CCR5, ACP1 E DAS ENZIMAS DE
METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS GSTT1, GSTP1 E CYP2E1**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia
Experimental da Universidade Federal de Rondônia – UNIR
como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em
Biologia Experimental.*

Área de Concentração: Parasitologia, nas relações
patógeno - Hospedeiro

Orientadora: *Prof^a Dra. Vera Engracia Gama de Oliveira*

Porto Velho – Rondônia

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP

574
F224c

Farias, Josileide Duarte De

Caracterização Genética de Região Endêmica de Malária da Amazônia Ocidental Brasileira: Descrição de Frequências Gênicas e Genotípicas dos locos CCR5, ACP1 e das Enzimas de Metabolismo de Xenobiótico GSTT1, GSTP1 e CYP2E1/ Josileide Duarte de Farias – Porto Velho, 2012.

117 p.

Tese (Doutorado) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, UNIR, 2012.

Orientação Profa. Dra. Vera Engraciana Gama de Oliveira

Área de concentração: Parasitologia, nas Relações Patógeno - Hospedeiro

1. Xenobióticos. 2. Malária. 3. Enzimas de Metabolismo. 4. GSTT1. 5. GSTP1. 6. CYP2E1. 7. CCR5. 8. ACP1. I. Título II. Oliveira, Vera Engracia Gama de

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária Joelma Gil CRB11/575

RESULTADO DA DEFESA

JOSILEIDE DUARTE DE FARIAS

Caracterização Genética de Região Endêmica de Malária da Amazônia Ocidental Brasileira: Descrição de Frequências Gênicas e Genotípicas dos Locos CCR5, ACP1 e das Enzimas de Metabolismo de Xenobióticos GSTT1, GSTP1 e CYP2E1.

Defendida e Aprovada em 24/02/2012.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Vera Engracia Gama de Oliveira – *Orientadora* (Presidente da Banca)

Instituição: *UNIR/PGBIOEXP* **Assinatura:** _____

Dr. Celso Teixeira Mendes Junior

Instituição: *FMRP/USP* **Assinatura:** _____

Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira

Instituição: _____ **Assinatura:** _____
FIOCRUZ/PGBIOEXP

Dr. Mauro Shugiro Tada

Instituição: *CEPEM/PGBIOEXP* **Assinatura:** _____

Dra. Francisca Luz Dias

Instituição: *FIMCA* **Assinatura:** _____

À minha família... Meu horizonte.

À minha querida mãe,

Anazilda Duarte de Farias

Que me deixou saudades...

Seu amor foi tudo pra mim

Seu exemplo? Orientação e dedicação incondicional

Sei que os sonhos que vivi, são os sonhos que queria para mim...

*“Esquecendo-me das coisas que para trás
ficam e avançando para as que diante de
mim estão”*

Fp 3:13

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora, Dra. Vera Engracia Gama de Oliveira pela orientação neste trabalho, cuja dedicação e paciência foram essenciais para sua concretização, por ter colaborado direta e continuamente para o meu aprendizado, por me dar a oportunidade de aprender uma Genética, universal, experiência pessoal, sempre serei grata.

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana onde desenvolvi minhas pesquisas, em especial Almeida, Andonai e Marlene, por serem meus companheiros nessa jornada, aos estagiários de Iniciação científica, Roger, Paulo e Milena pelo ambiente cordial e amigo. Aos colegas do IPEPATRO Giovanni, Rosineide e Marlene Donato pelo apoio.

A minha amiga Joanna D'Arc que foi uma grande companheira de seminários durante o Doutorado.

Ao IPEPATRO e CEPPEM pelo apoio oferecido durante o desenvolvimento desse projeto.

Ao Programa de PG em Biologia Experimental, da Universidade Federal de Rondônia, pela oportunidade que este curso propiciou à minha formação Acadêmica e científica.

Aos Dr. Aguinaldo Luis Simões e Celso Mendes Jr., que me receberam em estágio, presentes em várias fases de minha trajetória Acadêmica, no Mestrado e Doutorado, Obrigada.

Aos membros da banca de qualificação, Drs. Gilson, Manuela, Celso, Mauro, também presente na banca de Defesa, Dr.s Ricardo, Celso, Mauro, Francisca membros da banca de Defesa, pelas críticas e contribuições, obrigada.

Aos sujeitos da Pesquisa, que viabilizaram o trabalho de Tese, e às Agências de fomento, especialmente CAPES e CNPq, o agradecimento e reconhecimento pelo trabalho que pude realizar.

A todos que, direta ou indiretamente, técnicos, auxiliares, professores do PGBIOEXP, colegas, caminharam comigo nesta jornada, obrigada.

Aos membros da banca de defesa, Obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. População e Área de Estudo	10
3.2. Métodos Laboratoriais.....	15
Análise do gene GSTT1	17
Análise do gene GSTP1	18
Análise do gene CPY2E1	20
Análise do gene CCR5.....	21
Análise do gene ACP1.....	22
3.3. Análises Estatísticas	24
4. RESULTADOS	27
4.1. Caracterização das Amostras	27
4.2. Frequências Gênicas e Genotípicas e Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg	29
4.3. Estimativa de Heterozigotos	36
4.4. Diferenciação Genética Populacional	37
4.5. Distribuição de Episódios de Malária	40
5. DISCUSSÃO.....	43
CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL DE RONDÔNIA	44
Mistura Étnica.....	44

ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE RONDÔNIA	58
Diferenciação Genética de Populações de Rondônia	58
Determinação da Estimativa de Heterozigotos	59
RELAÇÕES PATÓGENO-HOSPEDEIRO	61
Malária e Marcadores Genéticos	62
6. CONCLUSÕES.....	68
7. PERSPECTIVAS	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
Anexo I – Questionário Antropogenético.....	90
Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	91
Anexo III – Protocolo de Extração de DNA – Método Proteinase K.....	92
Anexo IV – Manuscrito	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Sequência de iniciadores para os sistemas polimórficos analisados no presente estudo.....	16
Tabela 02.	Distribuição dos sujeitos dos grupos amostrais segundo a cor da pele e traços físicos.....	28
Tabela 03.	Distribuição de frequências genotípicas e gênicas de CCR5 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.....	29
Tabela 04.	Distribuição de frequências genotípicas e gênicas de CYP2E1 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.....	29
Tabela 05.	Distribuição de frequências genotípicas e gênicas de GSTP1 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.....	30
Tabela 06.	Distribuição de frequências genotípicas e gênicas de GSTT1 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.....	30
Tabela 07.	Distribuição de frequências genotípicas e gênicas de ACP1 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.....	31
Tabela 08.	Distribuição genotípica segundo a etnia nas amostras de mães do Hospital de Base (HB).....	32
Tabela 09.	Distribuição genotípica segundo a etnia nas amostras de recém-nascidos do Hospital de Base.....	33
Tabela 10.	Distribuição genotípica segundo a etnia nas amostras de Candelária e Bate-Estaca, Porto Velho – Rondônia.....	34
Tabela 11.	Distribuição genotípica segundo a etnia nas amostras de Pedras Negras, Vale do Guaporé.....	35
Tabela 12.	Estimativa de excesso de heterozigotos nas amostras dos grupos populacionais segundos os sistemas genéticos analisados.....	36
Tabela 13.	Estimativa de deficiência de heterozigotos nas amostras dos grupos populacionais segundos os sistemas genéticos analisados.....	36
Tabela 14.	Diferenciação gênica interpopulacional entre pares das amostras.....	37
Tabela 15.	Diferenciação genotípica interpopulacional entre pares das amostras.....	38
Tabela 16.	Diferenciação gênica intrapopulacional de indivíduos com e sem infecção por <i>Plasmodium</i> das Vilas de Candelária e Bate-Estaca, Porto Velho – RO.....	39

Tabela 17.	Diferenciação genotípica intrapopulacional de indivíduos com e sem infecção por <i>Plasmodium</i> das Vilas de Candelária e Bate-Estaca, Porto Velho – RO.....	39
Tabela 18.	Distribuição genotípica das Vilas de Candelária e Bate-Estaca segundo infecção <i>Plasmodium</i>	40
Tabela 19.	Associação do loco CCR5 com variáveis de infecção por <i>Plasmodium</i> nas amostras dos bairros Candelária e Bate-estaca.....	41
Tabela 20.	Associação do loco CYP2E1 com variáveis de infecção por <i>Plasmodium</i> nas amostras dos bairros de Candelária e Bate-estaca.....	41
Tabela 21.	Associação do loco GSTT1 com variáveis de infecção por <i>Plasmodium</i> nas amostras dos bairros de Candelária e Bate-estaca.....	42
Tabela 22.	Associação do loco GSTP1 com variáveis de infecção por <i>Plasmodium</i> nas amostras dos bairros de Candelária e Bate-estaca.....	42
Tabela 23.	Frequências alélicas de CCR5Δ32 em diferentes populações brasileiras.....	49
Tabela 24.	Distribuição de frequência dos alelos de ACP1 em Europeus, Africanos Sub-Saarianos, portugueses e Ameríndios brasileiros.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Mapa do Brasil, indicando a localização geográfica de Porto Velho (capital) e remanescentes de quilombos (Pedras Negras e Santo Antônio do Guaporé).....	10
Figura 02.	Identificação dos fenótipos de GSTT1. <i>Lanes</i> 1, 3, 5, 6, 7 e 9: indivíduos com fenótipo positivo (1/1 ou 1/0); <i>Lanes</i> 2, 4, 8 10 e 11: indivíduos com fenótipo negativo (0/0). M: Marcador de Peso Molecular de 250 pb. PAGE 10%.....	17
Figura 03.	Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. M: marcador de peso molecular de 100pb. <i>Lane</i> 1: controle negativo; <i>Lanes</i> 2 a 14 amostras amplificadas.....	18
Figura 04.	Gel de poliacrilamida a 10% corado com AgNO ₃ 10%. M: marcador de peso molecular de 100pb. <i>Lane</i> 1: fragmento não digerido; <i>Lanes</i> 3, 5, 7, 9, 11, 15, 16, 17, 18: heterozigotos; <i>Lanes</i> 4, 13, 14: homozigotos para o alelo Val105; <i>Lanes</i> 2, 6, 8, 10 e 12: indivíduo homozigoto para o alelo Ile105; e <i>Lanes</i> 19: o controle negativo da digestão. PAGE 10%	19
Figura 05.	Identificação de alelos de CYP2E1 PCR-RFLP/ <i>Pst</i> I. <i>Lanes</i> 1, 2, 3 e 8: Indivíduos heterozigotos C1/C2; <i>Lanes</i> 4, 5, 6, 7 e 9: Indivíduos homozigotos C1/C1. M: marcador de Peso Molecular de 100 pb. PAGE 10%.....	20
Figura 06.	Identificação de alelos de CCR5. <i>Lanes</i> 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12: Indivíduos homozigotos CCR5/CCR5; <i>Lanes</i> 2, 4, 5, 10, 13: Indivíduos heterozigotos CCR5/CCR5Δ32. M: marcador de Peso Molecular de 50 pb. PAGE 10%.....	21
Figura 07.	Identificação de alelos ACP1 via PCR-RFLP. Digestão com Taq I. <i>Lane</i> 1. Não digerido; <i>Lanes</i> 2, 4 e 5: amostras que podem apresentar alelos *B ou *C; <i>Lanes</i> 3 e 6: homozigoto *A; <i>Lanes</i> 7, 8, 9 e 10: heterozigotos *A, *B e *C. M: Marcador de peso molecular 100 pb.....	22
Figura 08.	Identificação de alelos ACP1 via PCR-RFLP. Digestão com Cfo I. <i>Lane</i> 1: Não digerido; <i>Lanes</i> 2, 3, 4, 5 e 6 indivíduos que podem apresentar os alelos *A ou *B; <i>Lane</i> 7: heterozigoto *A ou *B/*C. M: Marcador de Peso Molecular de 50 pb. PAGE 10%.....	22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>Sigla ou Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
ACP1	<i>Acid Phosphatase, locus 1</i>
CBE	<i>Vilas de Candelária e Bate-Estaca</i>
CCR5	<i>Chemotactic Cytokine Chemokine Receptor 5</i>
CEMETRON	<i>Centro de Medicina Tropical de Rondônia</i>
CEPEM	<i>Centro de Pesquisa em Medicina Tropical</i>
cLMWPTP	<i>Cytosolic Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase</i>
cols.	<i>Colaboradores</i>
CONEP	<i>Comissão Nacional de Ética em Pesquisa</i>
CXCR4	<i>CXC Chemokine Receptor 4</i>
CYP	<i>Citocromo P450</i>
CYP2E1	<i>Citocromo P450 2E1</i>
dNTP	<i>Desoxinucleotídeo</i>
DP	<i>Desvio Padrão</i>
EC	<i>Enzyme Code</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EFMM	<i>Estrada de Ferro Madeira-Mamoré</i>
FAD	<i>Flavina Adenina Dinucleotídeo</i>
FMN	<i>Flavina Mononucleotídeo</i>
GST(s)	<i>Glutathione S-Transferase(s)</i>
GSTP1	<i>Glutathione S-Transferase, classe Pi , locus 1</i>
GSTT1	<i>Glutathione S-Transferase, classe Theta, locus 1</i>
HB	<i>Hospital de Base</i>
HBM	<i>Parturientes</i>
HBRN	<i>Recém-nascidos</i>

<i>HIV-1</i>	<i>Human Immunodeficiency Virus, type 1</i>
<i>IBGE</i>	<i>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</i>
<i>IPA</i>	<i>Índice Parasitário Anual</i>
<i>IPEPATRO</i>	<i>Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais</i>
<i>MPI</i>	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
<i>NAT(s)</i>	<i>N-acetiltransferase(s)</i>
<i>PAGE</i>	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<i>Pb</i>	<i>Pares de bases</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>PN</i>	<i>Pedras Negras</i>
<i>RANTES</i>	<i>Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted</i>
<i>RFLP</i>	<i>Polimorfismos de Comprimento de Fragmento de Restrição,</i>
<i>RN</i>	<i>Recém-nascidos</i>
<i>SESAU</i>	<i>Secretaria Estadual de Saúde</i>
<i>TBE</i>	<i>Tris-Ácido Bórico-EDTA</i>

RESUMO

FARIAS, J. D. *Caracterização genética de região endêmica de malária da Amazônia Ocidental Brasileira: Descrição de frequências gênicas e genotípicas dos locos CCR5, ACP1 e das enzimas de metabolismo de xenobióticos GSTT1, GSTP1 e CYP2E1*. 2012. 127 f. Tese. Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho – Rondônia, Brasil.

Doenças infecciosas têm sido consideradas, nas últimas décadas, como um forte fator seletivo no modelamento da resposta genética humana aos xenobióticos. Numerosos genes podem estar envolvidos na regulação deste processo e, apesar dos avanços tecnológicos envolvendo análises genômicas poucos genes foram identificados como exercendo o papel de modelador desta individualidade. Analisamos a distribuição dos genes CCR5, ACP1, GSTT1, GSTP1 e CYP2E1 em cinco amostras coletadas em duas localidades do estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira, região endêmica para malária e outras doenças, algumas reemergentes. Foram também investigadas, em todas as amostras, as associações entre alelos dos genes investigados com fenótipos clínicos resultantes der infecção por *Plasmodium*. Quatro amostras foram coletadas na capital Porto Velho, sendo duas representativas da população geral, uma de um bairro com altos índices de infecção por malária e uma ambulatorial, de pacientes com infecção por *Plasmodium*. A quinta amostra foi coletada no vilarejo de Pedras Negras, localizada no Vale do rio Guaporé, região de origem quilombola, quase um isolado, com pouca influência de povoamento por ondas migracionais. O DNA foi extraído seguindo a metodologia por digestão com Proteinase K. As amostras foram genotipadas com amplificação via PCR das regiões alvos conforme o protocolo indicado para a região gênica. A visualização ocorreu em PAGE 10% corado com nitrato de prata 10%. As análises estatísticas foram realizadas com os programas GENEPOP (versão 3.4). O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados obtidos indicam que as distribuições gênicas e genotípicas destes locos gênicos são

semelhantes às de outras populações brasileiras e estão associadas ao padrão étnico das populações estudadas. No loco CCR5, o alelo CCR5 Δ 32, considerado marcador caucasóide, foi detectada em todas as amostras, inclusive na amostra do vilarejo quilombola de Pedras Negras, indicando a introdução de genes Europeus em uma comunidade quilombola. Este alelo CCR5 Δ 32 poderá ser um agente modulador da disseminação do vírus HIV-1 nesta região, dado o aumento do índice de pessoas infectadas pelo vírus. O alelo ACP1*C foi observado no grupo de Mães do Hospital de Base, de Porto Velho, em associação com infecção por *P. vivax* e mista, mas não por *P. falciparum* exclusivamente. Não foi possível estabelecermos uma base biológica nas associações entre os genes estudados e fenótipos clínicos de malária. Nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada.

Palavras-Chaves: Polimorfismo Genético, Caracterização Populacional, Rondônia, Doenças Infecciosas, Malária.

ABSTRACT

FARIAS, J. D. *Genetic Characterization of malaria endemic region of the Western Brazilian Amazon: Description of gene and genotypic frequencies of the CCR5 loci, ACP1 and Enzymes of Metabolism of Xenobiotics GSTT1, GSTP1 and CYP2E1*. 2012. 127 p. Thesis. Federal University of Rondônia, Porto Velho – Rondônia, Brazil.

Infectious diseases have been considered as a strong selective factor in the modeling of human genetic response to xenobiotics in recent decades. Many genes may be involved in this process of expression regulation, but despite technological advances, few genes have been identified in this modeling process of genetic individuality. The aim of our study was to analyse the allelic's distribution of CCR5, ACP1, GSTT1, GSTP1 and CYP2E1 genes in five samples collected from two localities in Rondônia state, located in the Western Brazilian Amazon region, where malaria is endemic, as well as the possible association of these genes with clinical phenotypes detected by Plasmodium infection. Four samples were collected in Porto Velho, the state capital and the site of several waves of migration, since the seventeenth century. Of these, two from the Hospital de Base were comprised of HB Mothers and HB Newborns, a third from the peri-urban neighborhoods of Candelária/Bate-Estaca and the fourth, from the Research Center on Tropical Medicine/CEPEM that was composed of malaria patients under treatment. The fifth sample came from the inland Quilombola village of Pedras Negras, situated in the Southwestern region of Rondonia in the Guaporé Valley, a region considered as isolated quilombola and suffered little migrational influence. DNA was extracted according to the methodology by digestion with proteinase K. The samples were genotyped by PCR amplification of target regions according to the protocol indicated in the region gene. Visualization took place in 10% PAGE stained with silver nitrate 10%. Statistical analyzes were performed using the programs GENETOP (version 3.4). The significance level was 5%. The results indicate that the gene and genotypic distributions of these gene loci are similar to other Brazilian populations and

are associated with ethnic pattern of the populations studied. In the CCR5 locus, the CCR5 Δ 32 allele, considered Caucasoid marker, was detected in all samples, including sample quilombola village of Pedras Negras, indicating the introduction of European genes in a quilombo. The presence of the CCR5 Δ 32 allele may be a modulating agent spread of HIV-1 in this region, because of the increasing number of people infected by the virus. The ACP1*C allele was observed in the HB Mothers sample associated with all phenotypes of malaria reported, except for women who reported *falciparum* malaria. It was not possible to establish a biological basis to explain the observed associations between allelic frequencies of the loci studied and the clinical phenotype of malaria, *vivax* and *falciparum*

KeyWords: Genetic Polymorphism, Populational Characterization, Rondônia, Infectious Diseases, Malaria.

1. INTRODUÇÃO

O entendimento sobre as causas e evolução de doenças humanas, em nível molecular, vem sendo beneficiado nas últimas décadas. Um esboço da influência das doenças infecciosas na constituição do genoma humano foi feito por Garrod em 1931 (em Pereira da Silva e Engracia, 2002, para revisão), sugere que as doenças infecciosas podem ter exercido grande força seletiva no modelamento da individualidade bioquímica.

Os fatores genéticos de resistência ou suscetibilidade a doenças infecciosas, mais especificamente a malária, foram os primeiros a serem investigados a partir da metade do século passado (Kwiatkowski, 2000). A suscetibilidade genética do hospedeiro a agentes infecciosos varia, entre outros fatores, devido à presença, num dado loco cromossômico, de vários alelos de um dado gene, alguns dele com frequências polimórficas. Malária é considerada um fator da manutenção de alguns polimorfismos, como os mantidos por seleção balanceada.

Alguns polimorfismos influem no tratamento com antimaláricos, como o da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD), certos genótipos de GSTs e CYP, enzimas de metabolismo (biotransformação) de xenobióticos. Este é o mecanismo pelo qual as células mantêm-se íntegras mesmo sob a ação de drogas ou outros xenobióticos. Várias enzimas conhecidas que metabolizam drogas catalisam a ativação (aumentam a reatividade) e destoxificação (diminuem a toxicidade e facilitam a eliminação) dos xenobióticos (fase I e fase II da biotransformação). O principal sistema enzimático responsável pela oxidação de xenobióticos, na **Fase I**, é o Citocromo P450, envolvido na biotransformação de uma grande diversidade de xenobióticos e endobióticos. São proteínas ligadas à membrana, presentes em alta concentração no retículo endoplasmático e são principalmente expressas no fígado. Os substratos apresentam elevada diversidade química. São altamente polimórficas, estando descritos aproximadamente 350 alelos diferentes, funcionalmente ativos, exercem influência considerável em tratamentos quimioterápicos, na resposta à drogas ou na incidência de reações adversas. Este polimorfismo é resultante de deleção, duplicação, sendo que mutações deletérias criam genes inativos.

Um fator importante na toxicidade de um xenobiótico é a sua capacidade de ser excretado. Este processo é realizado na **Fase II**, principalmente pelas enzimas da família de Glutatio S-transferases (GSTs) e N-acetiltransferases (NATs). Devido à ação de destoxificação das GSTs, tem sido sugerido que estas enzimas desenvolvem um importante papel na suscetibilidade a vários tipos de doenças ambientais e infecto-contagiosas (Abbas e cols., 2004; Chen e cols., 2002; Mitrunen e cols., 2001; Brockmoller e cols., 1996). A atividade da GST foi associada a parasitas que causam doenças como a malária e a esquistossomose. A infecção pelo *Plasmodium* causa hepatomegalia no hospedeiro, afetando as funções do fígado e, conseqüentemente também altera a produção de enzimas hepáticas, inclusive as de metabolismo de xenobióticos (Ahmad e cols., 2006), numa resposta à interação hospedeiro-parasita, que se reflete na evolução clínica das doenças infecciosas, sua sintomatologia e tempo de recuperação.

Glutatio S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) é uma família de enzimas multifuncionais envolvidas na desintoxicação celular e excreção de várias substâncias fisiológicas (endobióticas) e externas (xenobióticas). Catalisam a adição nucleofílica de tiol de Glutatio reduzido (γ -glutamyl-citeinil-glicina) a outros eletrofílicos, em compostos orgânicos. O Glutatio conjugado formado dessa maneira torna-se mais solúvel em água, facilitando a eventual eliminação do composto. Nos seres humanos, a GST citosólica é uma família de enzimas diméricas, com subunidades de peso molecular de aproximadamente 25 Kda. Foram caracterizadas, por propriedades bioquímicas e de reação cruzada com anticorpos, cinco classes de enzimas GST: uma microssomal e quatro citosólicas, a α (*alfa*), μ (*mu*), π (*pi*) e θ (*theta*) (Armstrong, 2000; Mannervit e cols., 1992). A cloroquina diminui a atividade de GSTs, podendo comprometer a habilidade de desintoxicação destas enzimas. Desde que a progressão dos efeitos clínicos da malária aumenta o estresse oxidativo, a atividade de Glutatio S-Transferases pode aumentar a severidade da patologia da malária (Mukanganyama e cols. 1997; Kavishe e cols. 2006). Os eritrócitos sofrem estresse oxidativo durante infecção por *P. vivax* (Sarin e cols., 1993). Recentemente Sohail e cols. (2010) sugeriram que o polimorfismo observado no GST π está envolvido na patogenicidade da malária *vivax*.

GSTT1 classe *theta*, localizado na região cromossômica 22q11.2 (Coggan e cols., 1998; Gattás e cols., 2004), possui alelos com frequências polimórficas, o GSTT1*1 e o gene nulo, GSTT1*0. GSTT1*0 é um alelo não funcional resultante de uma deleção, aparentemente causada por uma recombinação homóloga envolvendo duas seqüências altamente repetitivas que flanqueiam o gene (HA3 e HA5), resultando na perda de 54 kb que contém o gene inteiro (Parl, 2005). Indivíduos com pelo menos um alelo funcional estão agrupados nos tipos de conjugação positiva e são chamados GSTT1-positivos. Indivíduos com fenótipo GSTT1 0/0 (ou nulo) são incapazes de produzir a proteína GSTT1 (Pemble e cols., 1994). O fenótipo homozigoto GSTT1 nulo tem sido descrito em diferentes populações e mostra uma grande variação (Nelson e cols., 1995; Rossini e cols., 2002; Gattás e cols., 2004; Santovito e cols., 2010).

O loco do gene GSTP1 encontra-se no cromossomo 11q13 e codifica uma enzima expressa primariamente em tecidos da placenta, baço, coração e pulmão. Board e cols. (1990) descreveram três diferentes alelos GSTP1, GSTP1a (ou GSTP1*A), GSTP1b (GSTP1*B) e GSTP1c (GSTP1*C). A variante GSTP1*B apresenta uma transição 313A→G no éxon 5, mudando o códon 105 de ATC (Ile) para GTC (Val). GSTP1*C é caracterizado por duas transições de nucleotídeos, sendo a primeira igual à observada no GSTP1*B, e a segunda, uma transição 341C→T no éxon 6, resultando na mudança de GCG (Ala) para GTG (Val) no códon 114. O códon 105 compreende parte do sítio ativo da enzima GSTP1 para a ligação de eletrofílicos reativos, e a substituição 105Ile →Val nas variantes GSTP1*B e GSTP1*C afeta a atividade catalítica substrato-específica e a estabilidade térmica da proteína codificada (Pandya e cols., 2000; Johansson e cols., 1998). Variações estruturais adicionais causadas pela mudança do aminoácido alanina para valina no códon 114 na GSTP1*C são de menor magnitude do que aquelas causadas por mudanças no códon 105. A classe *Pi* apresenta uma distribuição ampla nos tecidos humanos, sendo encontrada no fígado, no epitélio biliar, de adultos; no pâncreas nas células centroacinar e nos ductos, mas não nas ilhotas de Langerhans. Aproximadamente 90% da GST eritrocitária pertence à classe *Pi*. Sua função nos eritrócitos ainda é desconhecida, mas a membrana destas células apresenta um sistema de transporte ativo de xenobióticos conjugados ao glutatião. Assim, sugere-se que a GST eritrocitária tenha função de proteção de glóbulos vermelhos, eliminando,

assim, da corrente sanguínea, substâncias nocivas ao organismo (Huber e Almeida, 2008; Beutler e cols., 1988).

Ao redor de 57 genes ativos de P450 (CYP) e 58 pseudogenes foram descritos em decorrência do projeto Genoma Humano (Ingelman-Sundberg, 2005), integrando 10 famílias em vários locos polimórficos. As enzimas produzidas por estes genes são responsáveis pela síntese ou quebra (metabolismo) de várias moléculas ou substâncias químicas. O polimorfismo observado neste sistema pode alterar a função da enzima, efeito mais observável no metabolismo de medicamentos. O polimorfismo observado no gene CYP exerce importância considerável em tratamentos quimioterápicos, na resposta a drogas ou na incidência de reações adversas. As variações no metabolismo individual frequentemente resultam em toxicidade inesperada devido à liberação da droga, à variação genética, indução enzimática (ativação), e inibição do metabolismo de drogas (Evans e Relling, 1999; Kleyn e Vesell, 1998; Nebert, 1997; Daly, 1995; Gonzalez e Nebert, 1990). No tecido hepático existem altos índices de expressão de *CYPs*, mas todos os tecidos expressam essas enzimas em nível tecido-específico. Os membros das subfamílias *CYP1*, *CYP2* e *CYP3* são mais envolvidos com o metabolismo de xenobióticos e participam da fase I, chamada também de ativação (Autrup, 2000; Omura, 1999).

O gene do Citocromo P450 2E1 (CYP2E1) foi mapeado no cromossomo 10 (Okino e cols.; 1987), na região 10q24-qter (Kolble, 1993). Este gene apresenta sintonia com os locos CYP2C e CYP17. Um dos polimorfismos descritos para este gene apresenta um sítio de restrição para a enzima *PstI* no alelo mutante (CYP2E1*5B) devido a uma substituição 1293G→C (região promotora 5') do alelo CYP2E1*1A (Persson e cols., 1993), o que afetaria a transcrição, associando esse alelo com um aumento à suscetibilidade ao câncer de pulmão em fumantes (Autrup, 2000). A enzima CYP2E1 também tem um importante papel na conversão de etanol para acetaldeído e acetato, juntamente com as enzimas 2-alcool-desidrogenase e 2-aldeído-desidrogenase. Foram encontrados polimorfismos relacionados às três enzimas com diferentes frequências em grupos étnicos distintos conferindo níveis variáveis de metabolismo de etanol (Hayashi, Watanabe e Kawajiri, 1991). Ao todo, foram descritas 13 variantes alélicas para o gene CYP2E1 (Ingelman-Sundberg e cols., 2006) e é possível que

variantes alélicas apresentem diferentes níveis de expressão da enzima, influenciando assim a suscetibilidade individual (Persson e cols., 1993). Também tem sido descrito que múltiplas isoformas de CYP, dentre elas a CYP2E1, contribuem para o metabolismo da primaquina de uma forma diferencial no fígado humano (Ganesan e cols., 2009; Li e cols., 2003).

Influindo no processo de infecção encontramos os receptores de quimiocinas, que são moléculas transmembranares originalmente identificadas pelo seu envolvimento no tráfico leucocitário. O CCR5 em interação com o CD4 ganhou substancial interesse como um fator importante do hospedeiro para entrada na célula infectada pelo HIV-1 (Oppermann, 2004). A proteína receptora β -Quimiocina 5 (CCR5) media a quimiotaxia das células T e células fagocitárias para áreas de inflamação, respondendo as proteínas inflamatórias de macrófagos MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (Zagury e cols., 1998; Paxton e cols., 1996; Alam e cols., 1993). Os receptores de quimiocina CCR5 e CXCR4 podem atuar como co-receptores para o vírus HIV-1. O gene do receptor Quimiocina β -5 (CCR5) é essencial para a infecção das células CD4 do trópico-macrofágico (M-Tropic) pelo vírus HIV-1. A interação entre CCR5 e HIV-1 não representa a função natural desse receptor, e até o momento, o CCR5 como receptor tem tido um papel especulativo, desde que não são alcançadas introspecções sobre indivíduos ou sistemas celulares com os quais este receptor atua (Hütter e Ganepola, 2011). Além da deleção de 32 pares bases (CCR5 Δ 32) no éxon do CCR5, vários outros polimorfismos genéticos que ocorrem no gene CCR5, como as mutações A29S, L55Q e R60S, podem estar associados à suscetibilidade a infecção por HIV-1 (Hütter e Ganepola, 2011; Teixeira e cols., 2009; Howard e cols., 1999). Esta deleção de 32 pares bases (CCR5 Δ 32) em homozigose resulta em um truncamento da proteína tornando o receptor CCR5 não-funcional, proporcionando forte proteção aos indivíduos homozigotos (CCR5 Δ 32/CCR5 Δ 32) à infecção pelo vírus HIV-1 e uma progressão diminuída para a condição de AIDS em indivíduos heterozigotos (CCR5/CCR5 Δ 32) (Sidoti e cols., 2005; Marmor e cols., 2001; Sullivan e cols., 2001; Wilkinson e cols., 1998; Dean e cols., 1996). Polimorfismos no gene CCR5, bem como outros receptores de quimiocinas, têm sido associados a susceptibilidade para outras doenças infecciosas, como Doença de

Chagas e Hepatite C (Cunha-Neto e cols., 2009; Hellier e cols., 2003). Vários estudos têm relatado o envolvimento de quimiocinas e seus receptores em patologias como a malária cerebral, frequente em indivíduos com infecção pelo *Plasmodium falciparum*, e sua patogênese possui provável envolvimento na seqüestração do parasita na microvasculatura cerebral (Murphy e Breman, 2001) e na resposta imune ao *P. falciparum*, incluindo respostas de citocinas (Hunt e cols., 2006). O alelo CCR5 Δ 32 parece ter origem recente no Nordeste da Europa, sendo que Lidén e cols. (2006) dataram o evento desta mutação para aproximadamente 7.000 anos atrás, sugerindo que esta deleção era freqüente nas antigas populações européias. Sugerem ser possível avaliar a influência da população européia na constituição genética de outras populações com base na freqüência do alelo CCR5 Δ 32.

Outro sistema genético que promove fenótipos clínicos variados em doenças infecciosas é o loco 1 de Fosfatase ácida (ACP1, atualmente também chamada de cLMWPTP: *cytosolic Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase*) é um membro da família de fosfatases ácidas de baixo peso molecular que são encontradas em todos os tecidos humanos. A enzima é controlada por um loco no cromossomo 2 (2p25) e foram descritos três alelos comuns: ACP1*A, ACP1*B e ACP1*C. Estes alelos apresentam diferenças quantitativas na atividade enzimática entre os genótipos ACP1 (revisão em Bottini e cols., 2005). A fosfatase ácida ou proteína citosólica de baixo peso molecular (18 Kb) é uma enzima polimórfica composta de duas isoformas, *f* e *s*, que mostram forte variação na expressão entre os genótipos (Dissing e cols., 1993; Dissing e cols., 1987). Bryson e cols. (1995), mostraram que ACP1 contém 7 éxons com um promotor rico em GC, apresentando *splicing* alternativo dos éxons 3 e 4, gerando assim as duas isoformas de ACP1. As funções desta enzima *in vivo* não estão bem esclarecidas (Bottini e cols., 2002). Estudos bioquímicos sugerem duas diferentes funções fisiológicas para ACP1: fosfatase flavina-mononucleotideo e proteína tirosina fosfatase. Como fosfatase flavina-mononucleotideo, na regulação da concentração da flavina mononucleotideo (FMN) e flavina adenina dinucleotideo (FAD), a ACP1 influencia na atividade da flavo-enzima e energia de metabolismo. Como proteína tirosina fosfatase, a ACP1 é viável para hidrolisar peptídeos contendo fosfotirosina do receptor da insulina

humana e da proteína de banda III (B3P; Bottini e cols., 2009; Bottini e cols., 2002). Palmarino e cols. (1975) aventaram a hipótese de existência de um provável papel fisiológico da ACP1, no eritrócito, ao descreverem correlação negativa estatisticamente significativa entre níveis de ACP1 e resistência a malária. Estudos em populações da Sardenha, região da Itália endêmica para malária, até o final dos anos 1930, descreveram concentração menor da isoforma *s* quando comparada com outra população nunca endêmica de malária, sugerindo que genótipos com altas concentração de isoforma *s* podem ter sido submetidos a seleção negativa em um ambiente com malária. O mecanismo bioquímico pelo qual a ACP1 modula a malária (Bottini, 1999; Bottini e cols., 2001) pode estar relacionado com os envolvidos no favismo, doença de metabolismo comum na região Mediterrânea, decorrente da ingestão do feijão *Vicia fava*. A infecção de eritrócitos por *Plasmodium falciparum* envolve uma mudança conformacional na banda III (Oh e cols., 1997) e contribui para propriedades de citoaderência de células vermelhas infectadas. O estado de fosforilação da banda III pode afetar esse processo. Em indivíduos portadores ou homozigotos do alelo *C, a alta concentração da isoforma *s* diminui a fosforilação da banda III, levando a diminuição da resistência à invasão pelo parasita (Bottini e cols., 2002).

O alto índice de miscigenação da população brasileira oferece um grande potencial de investigação em suscetibilidade/resistência a patógenos, devido à diversidade de combinações de variantes em diferentes locos gênicos possibilitando o estudo de interações gênicas, que em populações homogêneas não seria possível (Zembrusk e cols., 2006). Os brasileiros formam uma das mais heterogêneas populações do mundo e é relevante analisar como os três grupos (Europeus, Africanos e Ameríndios) contribuíram para a formação do perfil genético da população atual (Carvalho-Silva e cols., 2001). A miscigenação entre portugueses e ameríndios começou com a chegada dos primeiros colonizadores, e o casamento entre homens europeus e mulheres indígenas foi estimulado, dentre outros fatores, como uma estratégia de crescimento populacional (Salzano e Freire-Maia, 1967). No início do século XVI, os africanos foram introduzidos como escravos no país, a fim de trabalharem no cultivo de

cana-de-açúcar, posteriormente na extração de ouro e diamante e, por fim, no cultivo de cafezais (Alves-Silva e cols., 2000).

A colonização da Região Amazônica ocorreu gradualmente, sendo que os primeiros relatos sobre sua ocupação são datados a partir de 1650, quando Europeus (holandeses, ingleses e franceses) navegaram pelos rios da Amazônia, tentando fixar núcleos de povoamento e colonização (Teixeira e Ribeiro da Fonseca, 1998). As ameaças de ocupação dos rios amazônicos e do Vale do Guaporé no século XVII incentivaram Portugal a enviar as primeiras expedições formadas por jesuítas, soldados, escravos e colonos portugueses que se instalaram formando núcleos de ocupação permanente na região da Bacia Amazônia (Pinto, 1993). A contribuição de genes Ameríndios, Africanos e Europeus à estrutura de populações segue padrões diversos, ao longo da Amazônia. Em Rondônia, migração é o parâmetro que mais influência exerce na estrutura de sua população (Teixeira e Ribeiro da Fonseca, 1998). Rondônia, estado da região norte do Brasil, foi colonizado a partir de várias ondas migratórias, sendo que a capital Porto Velho e regiões próximas a ela receberam na década de 70, vários trabalhadores oriundos do Sul e Sudeste do Brasil, descendentes de italianos, alemães, dentre outras. Contribuíram, assim, para a miscigenação da população de Rondônia a colonização européia do século XVIII (ao redor de 1723), a explosão da cultura da borracha (migrações internas do século XIX e XX), a construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré (brasileiros do nordeste e estrangeiros, principalmente do Caribe), do início do século XX, e as grandes migrações iniciadas com a construção da rodovia BR 364, que liga a Amazônia Ocidental brasileira ao Sul e Sudeste do Brasil, a partir dos anos 1970. As características genéticas, advindas do intenso fluxo gênico de várias ondas migratórias, observadas desde o século XVII até os dias atuais, tornam a população deste estado propícia a estudos de associação com doença, devido à presença de doenças infecciosas endêmicas e de genes de origem ameríndia, africana e européia. Nossa hipótese de trabalho foi que a distribuição destes genes pode refletir a história de povoamento desta região bem como incluir nos fenótipos clínicos de infecção por plasmódio.

2. OBJETIVOS

Analisar a associação entre os locos CCR5, ACP1 e das enzimas de metabolismo de xenobióticos GSTT1, GSTP1 e CYP2E1 e fenótipos clínicos por infecção por *Plasmodium*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimando as frequências alélicas e genotípicas dos locos CCR5, ACP1 e das enzimas de metabolismo de xenobióticos GSTT1, GSTP1 e CYP2E1 em amostras populacionais de Rondônia;
- Estimando parâmetros populacionais, bem como o equilíbrio de Hardy-Weinberg e diferenciação gênica e genotípica entre os grupos populacionais analisados;
- Associando as frequências gênicas e genotípicas dos locos investigados com fatores genéticos e ambientais como idade, etnia e fenótipos de malária.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População e Área de Estudo

Cinco amostras foram coletadas em duas localidades de Rondônia: **1. Porto Velho** ($63^{\circ}54'14''$ W; $08^{\circ}45'43''$ S), capital do estado, com quatro amostras, sendo uma amostra populacional de indivíduos ribeirinhos compreendendo os bairros de Candelária e Bate-Estaca (CBE), duas hospitalares, provenientes do Hospital de Base, sendo uma amostra de Mães (HBM) e a outra seus respectivos filhos recém nascidos (HBRN). A quarta amostra foi coletada no ambulatório do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), ligado à Secretaria de Saúde (SESAU) do Governo do Estado de Rondônia, que atende pacientes com infecção por *Plasmodium*; **2. Pedras Negras** ($62^{\circ}54'$ O; $12^{\circ}51'$ S), vilarejo situado no vale do rio Guaporé, no interior do estado de Rondônia. A figura 01 identifica os locais da coleta.

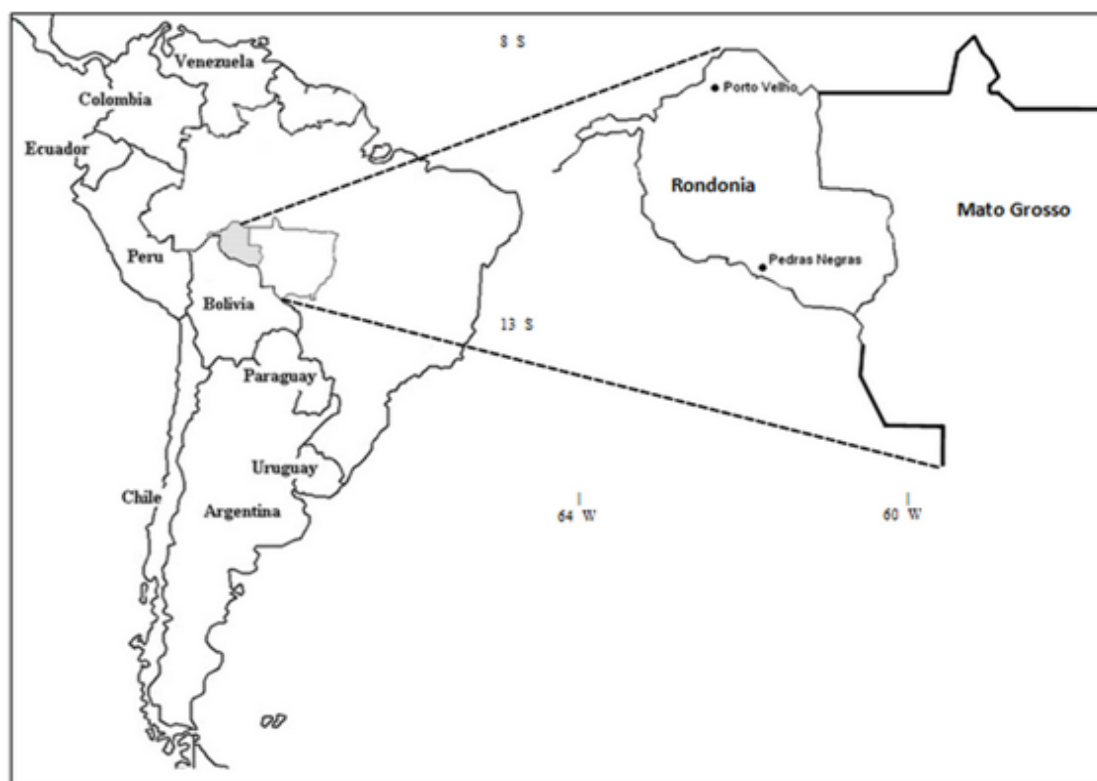


Figura 01. Mapa do Brasil, indicando a localização geográfica de Porto Velho (capital) e remanescentes de quilombos (Pedras Negras e Santo Antônio do Guaporé).

Em todas as amostras o procedimento de coleta de material biológico e dados antropogenéticos foi o mesmo. Na coleta de dados antropogenéticos (anexo I) foram obtidas informações sobre etnia, baseada na cor da pele e características morfológicas, dos sujeitos das amostras, que foram classificados em Branco, Negro, Mulato e Amarelo.

Coleta de Material Biológico: Foram coletados 5 ml de sangue periférico em tubos contendo EDTA, após consentimento escrito (anexo II). Nos recém-nascidos da amostra do Hospital de Base o sangue foi coletado no cordão umbilical. O sangue coletado foi transportado em recipientes refrigerados até o laboratório de Genética Humana do Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais (IPEPATRO), processado até 10hs após a coleta para separação de hemácias e de leucócitos, armazenado a -20°C, até o momento de uso, em alíquotas, para melhor conservação das amostras. Tanto a coleta das amostras, como o processamento, armazenamento e formação de banco de dados, seguiram as normas do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, resolução 196/96; Projeto aprovado sob número CONEP 3349/2001 renovado sob o número 13.356/2007).

a. Amostras da região de Porto Velho

Hospital de Base (HB)

As amostras de Mães e Recém-nascidos foram provenientes da maternidade do Hospital de Base Dr. Ary Pinheiro, principal hospital público do estado de Rondônia, situado em Porto Velho (63°49'14'' W; 08°39'44'' S). Na época da coleta (março e abril do ano 2005) o atendimento na maternidade abrangia todas as mulheres que procuravam os serviços deste Hospital, da capital Porto Velho, do interior de Rondônia e também da cidade fronteiriça de Humaitá, AM. Atualmente este serviço é reservado às grávidas de alto risco, havendo também atendimento ao recém-nascido (RN), com um berçário especializado em atendimento neonatal. Até o momento atual esta clientela de Mães e RN pertence às camadas economicamente mais deficitárias da sociedade.

HBM: foram coletados 5 ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA, de 315 mulheres. Seguindo procedimentos de técnicas hematológicas, empregadas na coleta de todo o material sanguíneo utilizado nesta pesquisa, o sangue foi mantido refrigerado em caixas de isopor com gelox até ser levado para o Laboratório de Genética Humana do Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais. Após separação de hemácias, soro e creme leucocitário, o material foi devidamente identificado e armazenado em Freezers a -20°C , até o momento de sua utilização.

HBRN: a coleta e armazenamento do material antropogenético e sanguíneo dos recém-nascidos seguiram os mesmos procedimentos descritos para as Mães. Foram coletados de 2 a 5 ml de sangue do cordão umbilical de 315 recém-nascidos, de ambos os sexos, com a colaboração de profissionais do Centro Obstétrico e do laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Base do Estado de Rondônia.

Bairros de Candelária e Batestaca (CBE)

Candelária localiza-se em região periurbana de Porto Velho, com característica de região ribeirinha, à margem direita do rio Madeira. Dista aproximadamente 5 Km do centro comercial de Porto Velho, e seus habitantes vivem da pesca e pequenas atividades agrícolas. O povoamento desta região data da época da construção da estrada de ferro Madeira-Mamoré, no começo do século XX, quando passou a receber imigrantes de diferentes países, dentre os quais se destacaram os negros de origem barbadiana. Bate-Estaca é vizinha a Candelária, mas o povoamento é recente com cerca de duas décadas de formação.

As amostras encontravam-se armazenadas em Freezer -20°C no Laboratório de Genética Humana do IPEPATRO. A coleta de dados antropogenéticos e amostras sanguíneas, realizada por equipe do Laboratório de Genética Humana, seguiram os procedimentos já descritos e ocorreu no período de 2001 a 2002. Os indivíduos da amostra foram seguidos longitudinalmente por equipes de médicos e paramédicos do CEPEN, sob a Coordenação do Dr. Mauro S. Tada.

Os 225 indivíduos averiguados em Candelária pertenciam a 32 grupos (família nuclear), com alto grau de parentesco entre elas. Para nossas análises foram classificados em indivíduos com parentesco (142/225) e sem parentesco (83/225). Analisamos apenas o grupo sem parentesco formado essencialmente por indivíduos adultos que não fossem relacionados com nenhum outro indivíduo de nossa amostra total.

O bairro de Bate-Estaca foi representado por 15 grupos familiares. Diferentemente de Candelária, sua população não é constituída por grandes grupos de famílias e na sua maioria apresenta-se como famílias isoladas e que permanecem por 2 ou 3 anos nessa região. Os núcleos familiares de Bate-Estaca totalizaram 73 amostras, e semelhantemente à vila de Candelária, estas amostras foram subdivididas em indivíduos com parentesco (45/73) e sem parentesco (28/73). No total, foram analisados 83 de Candelária e 28 de Bate-Estaca, no total de 111 indivíduos sem parentesco.

Pacientes com Infecção por *Plasmodium*

As amostras deste grupo foram provenientes de moradores da cidade de Porto Velho ou de localidades vizinhas ou rurais que procuraram o posto de atendimento especializado em pesquisa de *Plasmodium* no CEPEN para diagnóstico e tratamento da doença, no período de 2001 a 2003. Estas amostras foram obtidas em colaboração com a Doutoranda Joana D’Arc Neves Costa, em pesquisa do CEPEN sobre alto nível de parasitemia de *Plasmodium falciparum* e/ou *Plasmodium vivax* em indivíduos infectados. O grupo foi constituído de 84 amostras de indivíduos sem parentesco.

b. Amostra da região do Vale do Guaporé (Pedras Negras)

Pedras Negras é um vilarejo pertencente ao município de São Francisco do Guaporé na região do Vale do rio Guaporé, região de transição entre o Pantanal matogrossense e a Amazônia Ocidental. Sua população, de formação Quilombola, originou-se de descendentes de escravos que fugiram durante o período da mineração de ouro no Mato Grosso e de extração de borracha na região de Costa Marques (RO), entre 1734 e 1835. Estes primeiros habitantes chegaram ao Vale do Guaporé há pelo menos 200 anos, sendo a única região no estado de Rondônia com população originalmente quilombola, e que apresenta baixos índices de migração. Esta amostra foi constituída por 29 indivíduos não aparentados, moradores do vilarejo de Pedras Negras (PN). A coleta do material biológico ocorreu em 2002 por um grupo de pesquisadores do Laboratório de Genética Humana do IPEPATRO e médicos da cidade de Costa Marques, localizada próximo a Pedras Negras.

3.2. Métodos Laboratoriais

Extração de DNA

O DNA foi extraído, segundo protocolo descrito por Higuchi (1989), a partir de 500 µl de sangue total, logo após a coleta, sendo em seguida armazenado a – 20°C até o momento da análise (anexo III). O sangue remanescente foi centrifugado e armazenado, sendo a fase leucocitária (*Buffer Coat*) tratada com glicerol tamponado (Citrato de potássio tribásico 0,1 M; fosfato de sódio monobásico dihidratado 0,345 M; fosfato de sódio bibásico anidro 0,0344 M; glicerol 60 % e água destilada 40 %) e armazenada a -20°C para futuras análises.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram desenvolvidas em termociclador Eppendorf, modelo Mastercycler, e termociclador Biocycler, modelo MJ96+/MJ96G Gradient Thermal Cycler, seguindo os protocolos específicos para cada sistema, já descritos na literatura e com adaptações. Os reagentes utilizados na PCR compreenderam dNTPs 100mM, Taq DNA Polimerase 5U/µl, tampão 10X da Enzima taq, $MgCl_2$ 50mM, *primers* específicos (Tabela 01) e 3µL de DNA genômico para um volume final de reação de 25µL.

A análise dos resultados deu-se em gel de agarose 1,5% com corrida eletroforética a 100 V em tampão TBE 10X (Tris-HCl 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M e EDTA 10 mM), corado com brometo de etídio e visualização em luz UV. Também foi utilizado gel de Poliacrilamida a 10% (PAGE) com corrida eletroforética a 100 V, corado com nitrato de prata 10% ($AgNO_3$). O tempo de corrida variou entre 1 H a 1H e 30 min, de acordo com o sistema a ser analisado.

Tabela 01. Sequência de iniciadores para os sistemas polimórficos analisados no presente estudo.

<i>Loco</i>	<i>Sequências iniciadoras</i>	<i>RFLP</i>	<i>Referência</i>
GSTT1	T1 - TTCCTTACTggTCCTCACATCTC T2 – TCACCggATCATggCCAgCA	Sem digestão enzimática	1
CYP1A1 (controle)	CYP1.1 - gGAACTgCCACTTCAGCTgTCT CYP1.2 - CAgCTgCATTTggAAgTgCTC	Sem digestão enzimática	1
GSTP1	P105F – ACCCCAgggCTCTATggAA P105R – TgAgggCACAAgAAgCCCCT	<i>Alw261</i>	2
CYP2E1	CYP2.1 – CCAgTCgACTCTACATTgTCA CYP2.2 – TTCATTCTgTCTTCTAACTgg	<i>PstI</i>	3
CCR5	CCR5F – ggTCTTCATTACACCTgC CCR5R – AggATTCCCgAgTAgCAgATg	Sem digestão enzimática	4
ACP1	#263 - AggCCAACCTgAACTCCTCT	<i>CfoI</i>	5
	#264 - CTgTCTTgCTTTATgggCT		
	#267- TTCAgAAgACCCTAgCAgATg	<i>TaqI</i>	5
	#268 - TggCAAAACCTgCATAACAA		

1. Abdel-Radman e cols., 1996; **2.** Harries e cols., 1997; **3.** Kato e cols., 1992; **4.** Chies e Hutz, 2003; **5.** Lazaruk, 1995.

Análise do gene GSTT1

O sistema GSTT1 foi amplificado via PCR multiplex que compreende a amplificação simultânea de duas regiões específicas no DNA, amplificando a região alvo da GSTT1 que gera um fragmento de 480 pb, e uma região de CYP1A1 (protocolo adaptado de Abdel-Rahman e cols., 1996), produzindo um outro fragmento de 312 pb usado como controle de reação para o alelo nulo, como pode ser observado na figura 02.

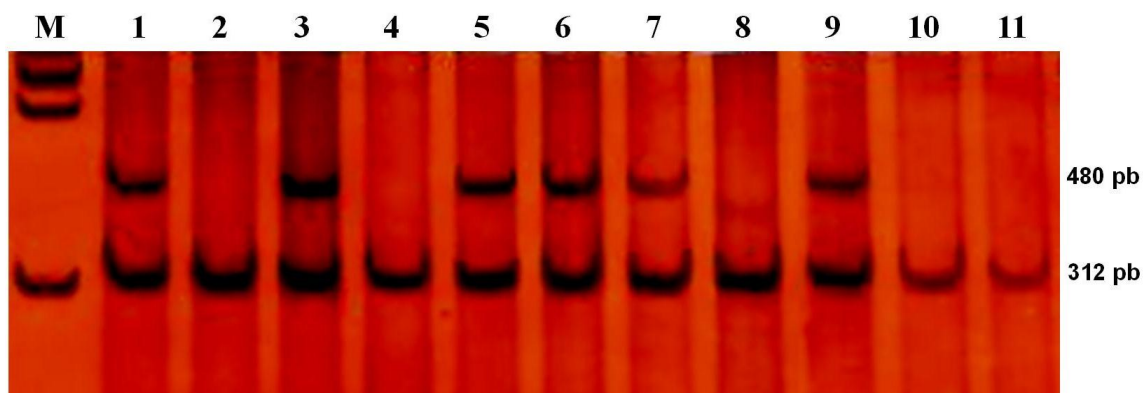


Figura 02. Identificação dos fenótipos de GSTT1. *Lanes* 1, 3, 5, 6, 7 e 9: indivíduos com fenótipo positivo (1/1 ou 1/0); *Lanes* 2, 4, 8 10 e 11: indivíduos com fenótipo negativo (0/0). M: Marcador de Peso Molecular de 250 pb. PAGE 10%.

Como condições de amplificação foram usados os *primers* específicos a uma concentração de 0,10 μ M, tanto para os *primers* da GSTT1 quanto para os *primers* controle CYP1A1.

O programa de amplificação do DNA utilizado foi:

- 94° C por 5 minutos para desnaturação do DNA;
Seguido por 35 ciclos de amplificação:
- 94° C por 2 minutos;
- 60° C por 1 minuto;
- 72° C por 1 minuto;
- E uma extensão final de:
- 72° C por 10 minutos.

Análise do gene GSTP1

Para a identificação alélica da GSTP1 utilizou-se a metodologia descrita por Harries e cols. (1997), com adaptações. Foram utilizados *primers* para a região alvo do gene, no éxon 5, em que há a troca de Isoleucina/ Valina na posição 105, devido a troca de adenina/guanosina na posição 1578. Os *primers* (tabela 07) anelam-se no íntron 5, amplificando a região, o que gera um fragmentos de 176 pb, figura 03.

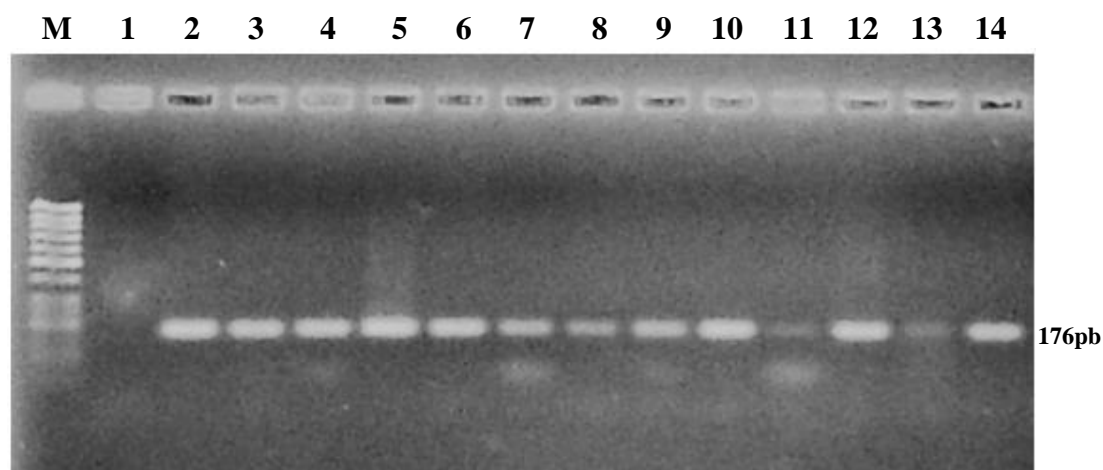


Figura 03. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. M: marcador de peso molecular de 100pb. Lane 1: controle negativo; *Lanes* 2 a 14 amostras amplificadas.

A PCR foi padronizada em 25µL, cada reação possui 3,5 pmol de cada primer, 200 µM de dNTP e 1,5 mM de MgCl₂.

O programa de amplificação para identificação GSTP1 foi:

- 94° C por 5 minutos para desnaturação do DNA;
- Seguido por 30 ciclos de amplificação:
- 94° C por 30 segundos;
- 61° C por 30 segundos;
- 72° C por 30 segundos;
- E uma extensão final de:
- 72° C por 5 minutos.

A troca de bases na posição 1578 A → G cria um sítio de restrição para a enzima *Alw261*, que identifica o alelo B (Val¹⁰⁵). Após esse processo, o produto de PCR foi submetido a uma digestão com a enzima de restrição *Alw261*, por um período de 5 horas, a 37°C com 7 µL do produto amplificado e 5U da enzima, seguido por um período de inativação de 20 minutos a 65°C. Os produtos de digestão enzimática foram separados em gel de poliacrilamida 10% corado com AgNO₃ 10%, figura 04.

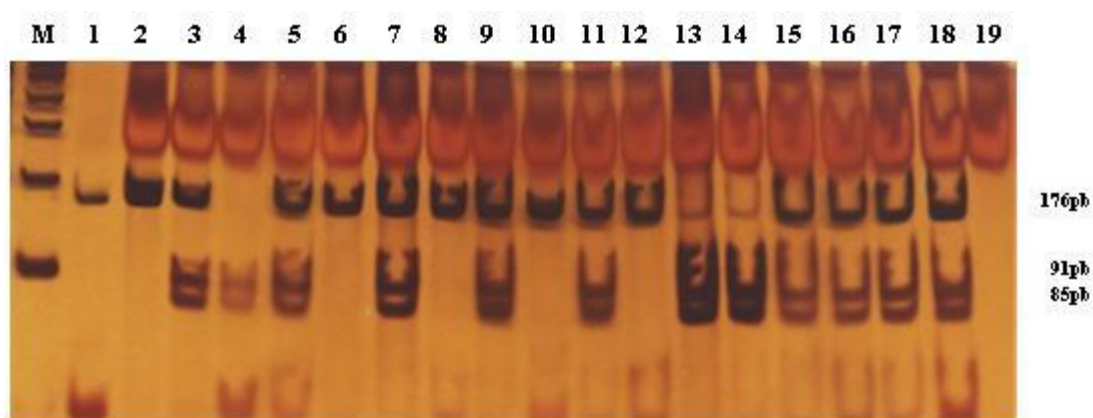


Figura 04. Gel de poliacrilamida a 10% corado com AgNO₃ 10%. M: marcador de peso molecular de 100pb. Lane 1: fragmento não digerido; Lanes 3, 5, 7, 9, 11, 15, 16, 17, 18: heterozigotos; Lanes 4, 13, 14: homozigotos para o alelo Val¹⁰⁵; Lanes 2, 6, 8, 10 e 12: indivíduo homozigoto para o alelo Ile¹⁰⁵; e Lanes 19: o controle negativo da digestão. PAGE 10%.

Análise do gene CPY2E1

A PCR-RFLP foi realizada para investigar o alelo CYP2E1*c2. A PCR foi usada para amplificar a região de regulação transcricional de CYP2E1 que inclui um sítio de restrição para enzima *Pst* I, como mostra a figura 05.

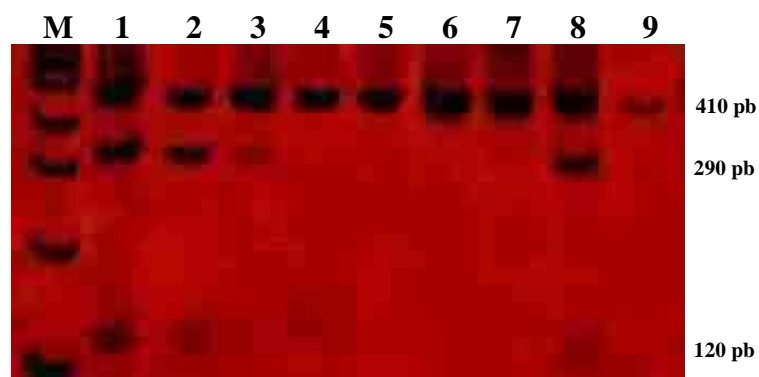


Figura 05. Identificação de alelos de CYP2E1 PCR-RFLP/*Pst* I. *Lanes* 1, 2, 3 e 8: Indivíduos heterozigotos C1/C2; *Lanes* 4, 5, 6, 7 e 9: Indivíduos homozigotos C1/C1. M: marcador de Peso Molecular de 100 pb. PAGE 10%.

A PCR foi padronizada em 25µL com *primers* em concentração de 0,25µM, 200 µM de dNTP e 1,2 mM de MgCl₂.

O programa de amplificação para a identificação do CYP2E1 foi:

- 94° C por 5 minutos para desnaturação do DNA;
Seguido por 30 ciclos de amplificação:
- 94° C por 1 minuto;
- 60° C por 30 segundos;
- 72° C por 1 minuto;
- E uma extensão final de:
- 72° C por 10 minutos.

Análise do gene *CCR5*

Os alelos do *CCR5* podem ser detectados por PCR direta usando-se *primers* específicos para os alelos tipo selvagem (WT, *wild type*) e $\Delta 32$, de acordo com Chies e Hutz (2003). Estes primers amplificam a região variante, gerando um fragmento de 137 pares de bases para o alelo WT e um fragmento de 105 pb que corresponde ao alelo com a deleção $\Delta 32$, como mostra a figura 06.

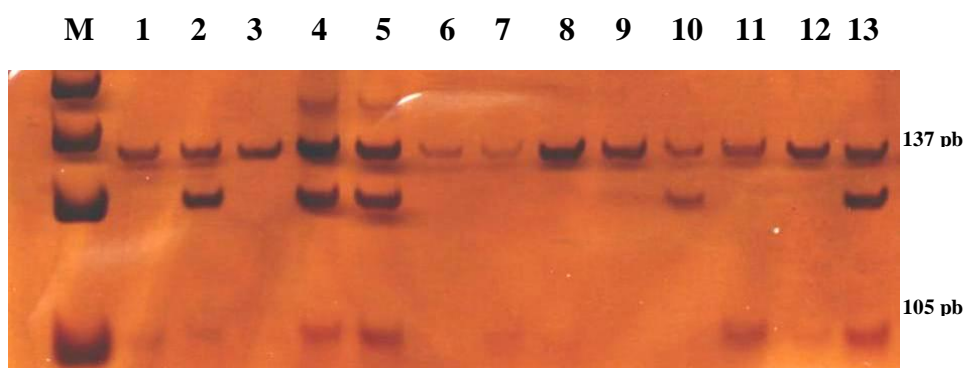


Figura 06. Identificação de alelos de *CCR5*. *Lanes* 1, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12: Indivíduos homozigotos *CCR5/CCR5*; *Lanes* 2, 4, 5, 10, 13: Indivíduos heterozigotos *CCR5/CCR5* $\Delta 32$. M: marcador de Peso Molecular de 50 pb. PAGE 10%.

A PCR foi padronizada em 25 μ L com *primers* em concentração de 0,25 μ M, 200 μ M de dNTP e 1,2 mM de $MgCl_2$.

Para a identificação dos alelos de *CCR5* usamos o seguinte Programa de amplificação:

- 94° C por 5 minutos para desnaturação do DNA;
Seguido por 30 ciclos de amplificação:
- 94° C por 1 minuto;
- 63° C por 1 minuto;
- 72° C por 1 minuto;
- E uma extensão final de:
- 72° C por 10 minutos.

Análise do gene ACP1

Após a extração de DNA, as amostras foram genotipadas com amplificação de duas regiões exônicas, sendo gerados um fragmento de 341 pb e outro de 299 pb em cada uma das PCRs, que posteriormente foram digeridos com *Taq I* e *Cfo I*, respectivamente. A visualização ocorreu em PAGE 10% corado com nitrato de prata 10%, figuras 07 e 08.

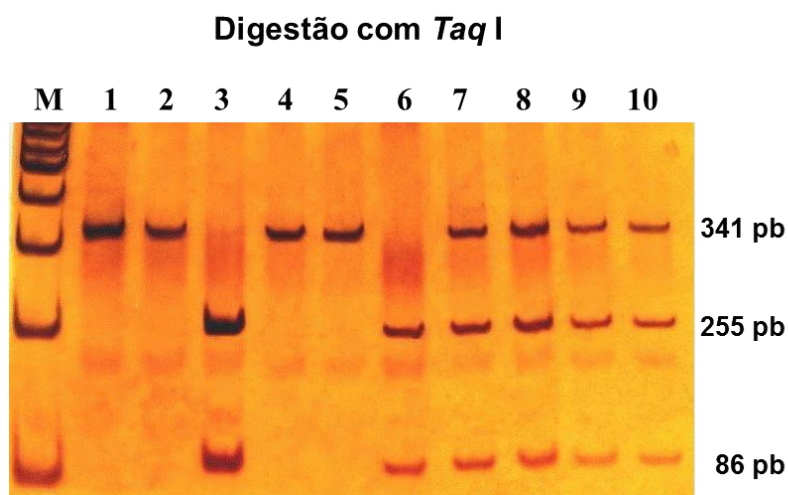


Figura 07. Identificação de alelos ACP1 via PCR-RFLP. **Digestão com *Taq I*.** Lane 1. Não digerido; Lanes 2, 4 e 5: amostras que podem apresentar alelos *B ou *C; Lanes 3 e 6: homozigoto *A; Lanes 7, 8, 9 e 10: heterozigotos *A, *B e *C. M: Marcador de peso molecular 100 pb.

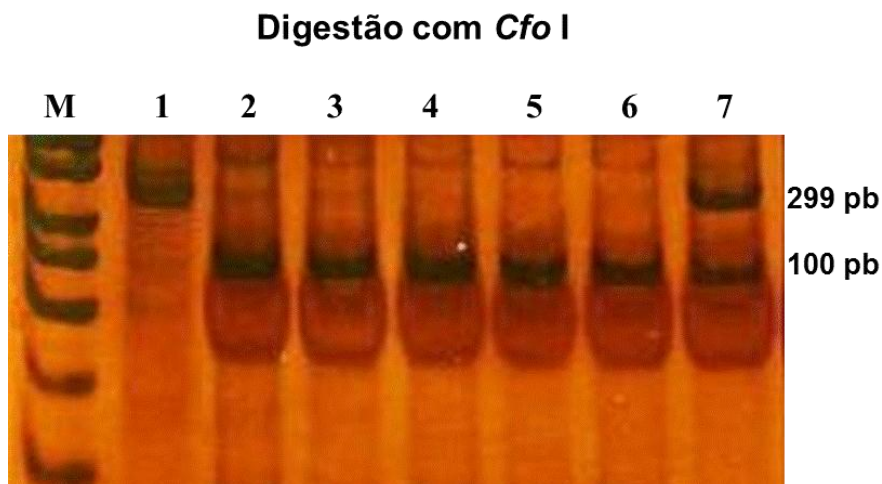


Figura 08. Identificação de alelos ACP1 via PCR-RFLP. **Digestão com *Cfo I*.** Lane 1: Não digerido; Lanes 2, 3, 4, 5 e 6 indivíduos que podem apresentar os alelos *A ou *B; Lane 7: heterozigoto *A ou *B/*C. M: Marcador de Peso Molecular de 50 pb. PAGE 10%.

A PCR foi padronizada em 25 μ L com *primers* em concentração de 0,2 μ mol, 200 μ M de dNTP e 1,2 mM de MgCl₂.

Os Programas que identificaram os alelos de ACP1 foram **PCR1** (*primers* # 267 e # 268) e **PCR2** (*primers* # 263 e # 264):

- 94° C por 2 minutos para desnaturação do DNA;
Seguido por 35 ciclos de amplificação:
 - 94° C por 45 segundos;
 - 60° C por 45 segundos;
 - 72° C por 45 segundos;
- E uma extensão final de:
- 72° C por 5 minutos.

3.3. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com programas de análise genética populacional. A estimativa de frequências gênicas e genotípicas e respectivos desvios-padrão foram obtidos através do programa GENEPOP (versão 3.4), assim como a verificação de excesso ou deficiência significativa de heterozigotos (Raymond e Rousset, 1995). Para as análises de associação foi utilizado o programa GraphPad InStat 3.0 for Windows que usa aproximação Woolf. O nível de significância adotado foi de 5%. Todos os dados obtidos nesta Pesquisa (moleculares e antropogenéticos) foram armazenados em banco de dados Access e Excel (Microsoft).

Estimativas das Frequências Alélicas e Genotípicas

As frequências alélicas (x_i) e genotípicas (X_{ii}) de cada loco, em cada grupo de amostras, foram estimadas por contagem direta, utilizando-se o programa GENEPOP, versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995).

$$\boxed{x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n}} \quad \text{e} \quad \boxed{X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}}$$

Em que:

x_i é a frequência do alelo “i”

X_{ii} é a frequência do genótipo “ii”

n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente

n corresponde ao número de indivíduos analisados.

Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O teste de aderência das frequências genotípicas observadas às proporções de Hardy-Weinberg foi verificada com o programa GENEPOP, versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995) que realiza o teste de Guo e Thompson (1992) estabelecendo-se a hipótese nula em situação de equilíbrio com união aleatória de gametas.

Estimativa de Heterozigotos

Este teste é baseado na hipótese nula de união aleatória dos gametas para detecção da deficiência ou excesso de heterozigotos. A estimativa foi realizada com o auxílio do programa GENEPOP, versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Estes testes são mais sensíveis que o de probabilidade e utilizam uma hipótese alternativa (H_1) de deficiência ou de excesso de heterozigotos, respectivamente.

Teste Exato de Diferenciação

Os testes de diferenciação populacional genética foram realizados a fim de determinar se existem diferenças nas frequências alélicas observadas entre duas amostras populacionais. Estes testes foram realizados utilizando-se o programa GENEPOP versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Este programa cria tabelas de contingência $R \times C$ geradas automaticamente para cada loco, em que R é o número de populações analisadas e C é o número de alelos (ou genótipos) no loco, aplicando o teste exato de Fisher. Neste teste a hipótese nula (H_0) assume que a distribuição alélica ou gênica entre as populações é estatisticamente semelhante, comparando cada loco em pares de populações. A distribuição genotípica para os locos autossômicos foi também analisada, através do teste exato G (Goudet e cols., 1996), com auxílio do programa GENEPOP. Este teste possui o mesmo princípio do teste de Fisher e testa a hipótese nula em que a distribuição genotípica é idêntica entre as populações.

Análise de Associação

Os dados foram analisados com programa estatístico GraphPad InStat 3.0 for Windows, utilizando o teste exato de Fisher, com índices de associação estimados através de testes não paramétricos para comparação entre dois grupos. Este teste calcula o *Odds ratio* com intervalo de confiança de 95% usando a aproximação de Woolf. Os resultados são considerados significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese nula for menor do que 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das Amostras

Foram analisadas quatro amostras de indivíduos pertencentes à população de Porto Velho, compreendendo duas da maternidade do Hospital de Base (mães e recém-nascidos), uma de moradores dos bairros Candelária e Bate-Estaca (CBE) e uma do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) localizado no CEMETRON (centro médico especializado em doenças tropicais de Rondônia). Moradores do vilarejo Pedras Negras (PN), pertencente ao município de São Francisco do Guaporé, situada no Vale do rio Guaporé, região remanescente de quilombolas no estado de Rondônia, constituíram a quinta amostra analisada.

Investigamos os sistemas genéticos CCR5, CYP2E1, GSTP1, GSTT1 e ACP1. Das amostras dos bairros de Candelária e Bate-Estaca e da vila de Pedras Negras, cuja coleta de amostras sanguíneas abrangeu todos os moradores, foram analisados apenas os indivíduos que não apresentavam parentesco entre si. As amostras de Mães e Recém-nascidos, do HB, foram consideradas como amostras independentes.

A tabela 02 resume os dados de caracterização étnica.

Tabela 02. Distribuição dos sujeitos dos grupos amostrais segundo a cor da pele e traços físicos.

População	Branco %	Mulato %	Negro %	Amarelo %
Mães	19,68	74,92	5,08	0,32
Recém-nascidos	17,15	80,95	0,95	0,95
Candelária e Bate-Estaca	31,53	62,53	6,31	-
Pedra Negras	14,64	63,41	21,95	-
Pacientes	-	-	-	-

4.2. Frequências Gênicas e Genotípicas e Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências gênicas e genotípicas correspondentes aos locos analisados dos grupos amostrais observadas nas tabelas de 03 a 07.

Tabela 03. Distribuição de frequências genotípicas e gênicas de CCR5 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.

Amostras	Frequências Gênicas e Genotípicas								
	¹ WT/WT		WT/Δ32		Δ32/Δ32		Alelo WT	Alelo Δ32	<i>p</i> ± <i>DP</i> ³
Mães	0,9355	(290)	0,0581	(18)	0,0065	(02)	0,965	0,035	0,0477 ± 0,153
Recém-nascidos	0,9377	(286)	0,0623	(19)	0,0000	(0)	0,969	0,031	P = 1,0 ± 0,030
² CBE	0,9640	(107)	0,0360	(04)	0,0000	(0)	0,982	0,018	P = 1,0 ± 0,013
Pedras Negras	0,9310	(27)	0,0690	(02)	0,0000	(0)	0,960	0,034	P = 1,0 ± 0,018
Pacientes	0,9881	(83)	0,0119	(01)	0,0000	(0)	0,994	0,006	P = 1,0 ± 0,000

¹ WT: Wild Tipe; ² Candelária e Bate-Estaca; ³ Desvio Padrão

Tabela 04. Distribuição de frequências genotípicas e gênicas de CYP2E1 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.

Amostras	Frequências Gênicas e Genotípicas								
	C*1/C*1		C*1/C*2		C*2/C*2		Alelo C*1	Alelo C*2	$p \pm DP^2$
Mães	0,8135	(253)	0,1865	(58)	0,0000	(0)	0,907	0,093	$0,0901 \pm 0,101$
Recém-nascidos	0,8606	(247)	0,1394	(40)	0,0000	(0)	0,931	0,069	$0,3774 \pm 0,073$
¹ CBE	0,9067	(68)	0,0933	(07)	0,0000	(0)	0,954	0,046	$P = 1,0 \pm 0,042$
Pedras Negras	0,8000	(12)	0,2000	(03)	0,0000	(0)	0,900	0,100	$P = 1,0 \pm 0,079$
Pacientes	0,8101	(64)	0,1899	(15)	0,0000	(0)	0,905	0,095	$P = 1,0 \pm 0,099$

¹ Candelária e Bate-Estaca; ² Desvio Padrão

Tabela 05. Distribuição de frequências genotípicas e gênicas de GSTP1 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.

Amostras	Frequências Gênicas e Genotípicas								
	GSTP1a/a		GSTP1a/b		GSTP1b/b		Alelo GSTP1a	Alelo GSTP1b	$p \pm DP^2$
Mães	0,3387	(105)	0,5323	(165)	0,1290	(40)	0,605	0,395	$0,0571 \pm 0,112$
Recém-nascidos	0,3322	(101)	0,5559	(169)	0,1118	(34)	0,611	0,389	$0,0038 \pm 0,167$
¹ CBE	0,3394	(37)	0,4864	(53)	0,1743	(19)	0,583	0,417	$P = 1,0 \pm 0,005$
Pedras Negras	0,6000	(09)	0,2667	(04)	0,1333	(02)	0,734	0,266	$0,2260 \pm 0,365$
Pacientes	0,4581	(33)	0,4375	(45)	0,1044	(04)	0,671	0,323	$0,0409 \pm 0,249$

¹ Candelária e Bate-Estaca; ² Desvio Padrão

Tabela 06. Distribuição de frequências fenotípicas e gênicas de GSTT1 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.

Amostras	Frequências Gênicas e Fenotípicas				
	1/*1 ou *1/*0 (GSTT1-positivo)		*0/*0 (GSTT1-negativo)		Alelo *0
Mães	0,8230	(251)	0,1770	(54)	0,420
Recém-nascidos	0,7559	(226)	0,2441	(73)	0,494
¹ CBE	0,6533	(49)	0,3466	(26)	0,588
Pedras Negras	0,5294	(09)	0,4706	(08)	0,686
Pacientes	0,4857	(17)	0,5143	(18)	0,717

¹ Candelária e Bate-Estaca

Tabela 07. Distribuição de frequências genotípicas e gênicas de ACP1 em diferentes amostras populacionais de Porto Velho – Rondônia, Brasil.

Genótipos	Frequências Genotípicas				Frequências Gênicas		
	Mães		Recém-Nascidos		Alelos	Mães	RNs
*A/*A	0,0194	(06)	0,0334	(10)	*A	0,1854	0,1939
*A/*B	0,3258	(101)	0,3144	(94)	*B	0,7983	0,7893
*A/*C	0,0065	(02)	0,0067	(02)	*C	0,0161	0,0167
*B/*B	0,6226	(193)	0,6187	(185)	$p \pm DP^1$	0,2349 \pm 0,056 0,9583 \pm 0,020	
*B/*C	0,0258	(08)	0,0268	(08)			
*C/*C	0,0000	(0)	0,0000	(0)			

¹ Desvio Padrão

Relacionando-se as frequências alélicas e genotípicas com cor da pele foram obtidos os seguintes resultados, resumidos nas tabelas de 08 a 11.

Tabela 08. Distribuição genotípica segundo a etnia nas amostras de mães do Hospital de Base (HB).

Sistema Genético	Cor da Pele							
	Branco		Mulato		Negro		Amarelo	
CCR5								
WT/WT	56	(0,9180)	217	(0,9353)	16		01	
WT/Δ32	05	(0,0820)	13	(0,0560)	0		0	
Δ32/Δ32	0	(0,0000)	02	(0,0087)	0		0	
Freq Al. Δ32	0,0409		0,0366					
p	0,2614		0,0017					
CYP2E1								
C1/C1	50	(0,8333)	191	(0,8162)	11	(0,6875)	01	
C1/C2	10	(0,1667)	43	(0,1838)	05	(0,3125)	0	
C2/C2	0	(0,0000)	0	(0,0000)	0	(0,0000)	0	
Freq Al. C2	0,0833		0,0919		0,1563			
p	0,4813		0,1217		0,1563			
GSTP1								
GSTPa/a	22	(0,3666)	75	(0,3219)	08	(0,5166)	0	
GSTPa/b	31	(0,5167)	126	(0,5408)	07	(0,4043)	01	
GSTPb/b	07	(0,1167)	32	(0,1373)	01	(0,0791)	0	
Freq Al. *b	0,3750		0,4977		0,2813		0,500	
p	0,4285		0,0677		0,7425		0,3173	
GSTT1								
*1/*1 ou *1/*0	44	(0,7586)	194	(0,8398)	12	(0,8000)	01	
*0/*0	14	(0,2414)	37	(0,1602)	03	(0,2000)	0	
Freq Al. *0	0,4913		0,4002		0,4472		0,0001	
ACPI								
*A/*A	01	(0,0167)	05	(0,0215)	0	(0,0000)	0	
*A/*B	23	(0,3833)	74	(0,3176)	03	(0,1875)	01	
*A/*C	0	(0,0000)	01	(0,0043)	01	(0,0625)	0	
*B/*B	36	(0,6000)	145	(0,6223)	12	(0,7500)	0	
*B/*C	0	(0,0000)	08	(0,0343)	0	(0,0000)	0	
Freq Al. *B	0,7917		0,7983		0,8437			
Freq Al. *C	0,0000		0,0193		0,0312			
p	0,9540		0,9141		0,2929			

Tabela 09 Distribuição genotípica segundo a etnia nas amostras de recém-nascidos do Hospital de Base.

Sistema Genético	Cor da Pele							
	Branco		Mulato		Negro		Amarelo	
CCR5								
WT/WT	54		226	(0,9224)	03		03	
WT/Δ32	0		19	(0,0776)	0		0	
Δ32/Δ32	0		0	(0,0000)	0		0	
Freq Al. Δ32	0,0388							
p	0,4721							
CYP2E1								
C1/C1	44	(0,8627)	197	(0,8565)	03		03	
C1/C2	07	(0,1373)	33	(0,1435)	0		0	
C2/C2	0	(0,0000)	0	(0,0000)	0		0	
Freq Al. C2	0,0686		0,0717					
p	0,4012		0,2412					
GSTP1								
GSTPa/a	21	(0,3889)	77	(0,3156)	02		01	(0,3333)
GSTPa/b	29	(0,5370)	138	(0,5655)	0		02	(0,6667)
GSTPb/b	04	(0,0741)	29	(0,1189)	01		0	(0,0000)
Freq Al. *b	0,3426		0,04016				0,3333	
p	0,1578		0,0058				0,6135	
GSTT1								
*1/*1 ou *1/*0	39	(0,7358)	185	(0,7708)	01	(0,3333)	01	(0,3333)
*0/*0	14	(0,2642)	55	(0,2292)	02	(0,6667)	02	(0,6667)
Freq Al. *0	0,5140		0,4787		0,8165		0,8165	
ACPI								
*A/*A	01	(0,0192)	09	(0,0373)	0	(0,0000)	0	(0,0000)
*A/*B	13	(0,2500)	78	(0,3237)	02	(0,3333)	01	(0,6667)
*A/*C	0	(0,0000)	02	(0,0083)	0	(0,0000)	0	(0,0000)
*B/*B	34	(0,6538)	148	(0,6141)	01	(0,6667)	02	(0,3333)
*B/*C	04	(0,0770)	04	(0,0166)	0	(0,0000)	0	(0,0000)
Freq Al. *B	0,8173		0,7842		0,6667		0,8333	
Freq Al. *C	0,0385		0,0124		0,0000		0,0000	
p	0,0105		0,0071		0,0067		0,0000	

Tabela 10. Distribuição genotípica segundo a etnia nas amostras de Candelária e Bate-Estaca, Porto Velho – Rondônia.

<i>Sistema</i>	<i>Cor da Pele</i>					
<i>Genético</i>	<i>Branco</i>		<i>Mulato</i>		<i>Negro</i>	
CCR5						
WT/WT	35		66	(0,9565)	07	
WT/Δ32	0		03	(0,0435)	0	
Δ32/Δ32	0		0	(0,0000)	0	
<i>Freq Al. Δ32</i>	0,0217					
<i>p</i>	0,1464					
CYP2E1						
C1/C1	18	(0,8571)	47	(0,9216)	03	
C1/C2	03	(0,1429)	04	(0,0784)	0	
C2/C2	0	(0,0000)	0	(0,0000)	0	
<i>Freq Al. C2</i>	0,0714		0,0392			
<i>p</i>	0,2755		0,2293			
GSTP1						
GSTPa/a	12	(0,3529)	23	(0,3382)	02	(0,2857)
GSTPa/b	17	(0,5000)	31	(0,4559)	05	(0,7143)
GSTPb/b	05	(0,1471)	14	(0,2059)	0	(0,0000)
<i>Freq Al. *b</i>	0,3971		0,4338		0,0217	
<i>p</i>	0,2037		0,4472		0,1416	
GSTT1						
*1/*1 ou *1/*0	14	(0,6087)	35	(0,6862)	0	
*0/*0	09	(0,3913)	16	(0,3137)	01	
<i>Freq Al. *0</i>	0,6225		0,5600			

Tabela 11. Distribuição genotípica segundo a etnia nas amostras de Pedras Negras, Vale do Guaporé.

Sistema Genético	Cor da Pele				
	Branco		Mulato		Negro
CCR5					
WT/WT	05		19	(0,9048)	03
WT/Δ32	0		02	(0,0952)	0
Δ32/Δ32	0		0	(0,0000)	0
Freq Al. Δ32	0,0476				
P	0,1812				
CYP2E1					
C1/C1	01	(0,5000)	10	(0,8333)	01
C1/C2	01	(0,5000)	02	(0,1667)	0
C2/C2	0	(0,0000)	0	(0,0000)	0
Freq Al. C2	0,2500		0,0833		
P	0,3626		0,2474		
GSTP1					
GSTPa/a	01	(0,5000)	06	(0,6000)	02
GSTPa/b	01	(0,5000)	03	(0,3000)	0
GSTPb/b	0	(0,0000)	01	(0,1000)	01
Freq Al. *b	0,2500		0,2500		
P	0,3626		0,4729		
GSTT1					
*1/*1 ou *1/*0	01	(0,5000)	08	(0,6667)	0
*0/*0	01	(0,5000)	04	(0,3333)	03
Freq Al. *0	0,7071		0,5774		

4.3. Estimativa de Heterozigotos

As tabelas 12 e 13 resumem os dados obtidos de estimativas de heterozigose.

Tabela 12. Estimativa de excesso de heterozigotos nas amostras dos grupos populacionais segundos os sistemas genéticos analisados (*p value*).

Amostra	<i>Estimativa de Excesso de Heterozigotos</i>			
	CCR5	CYPE21	GSTP1	ACP1
Mães	0,9959	0,0532	0,0415	0,0316
Recém-nascidos	0,7489	0,2321	0,3386	0,0024
CD & BE	0,9729	0,8638	0,4425	--
Pedras Negras	0,9825	0,8966	0,9792	--
Pacientes	1,0000	0,4805	0,0198	--

Tabela 13. Estimativa de deficiência de heterozigotos nas amostras dos grupos populacionais segundos os sistemas genéticos analisados (*p value*).

Amostra	<i>Estimativa de Deficiência de Heterozigotos</i>			
	CCR5	CYPE21	GSTP1	ACP1
Mães	0,0041	1,0000	0,9682	0,9821
Recém-nascidos	1,0000	1,0000	0,7004	0,9989
CD & BE	1,0000	1,0000	0,5575	--
Pedras Negras	1,0000	1,0000	0,2260	--
Pacientes	1,0000	1,0000	0,9956	--

4.4. Diferenciação Genética Populacional

Os testes de diferenciação genética populacional foram realizados par a par entre os grupos populacionais (tabelas 14 e 15) e entre subgrupos amostrais segundo infecção ou não por *Plasmodium* (tabelas 16 e 17).

Tabela 14. Diferenciação gênica interpopulacional entre pares das amostras.

Pares Amostrais	CCR5		CYPE1		GSTP1		ACPI		
	WT	$\Delta 32$	C1	C2	GSTP1a	GSTP1b	*A	*B	*C
HB x RN	598	22	564	58	375	245	115	495	10
	591	19	534	40	371	237	116	472	10
$p \pm DP$	0,7512 \pm 0,00180		0,1407 \pm 0,00305		0,85971 \pm 0,00238		0,93005 \pm 0,00132		
HB x CBE	598	22	564	58	375	245	-	-	-
	218	04	143	07	127	91	-	-	-
$p \pm DP$	0,2605 \pm 0,00179		0,0725 \pm 0,00168		0,5695 \pm 0,00420				
HB x PN	598	22	564	58	375	245	-	-	-
	56	02	27	03	22	08	-	-	-
$p \pm DP$	1,0000 \pm 0,00000		0,7535 \pm 0,00091		0,1837 \pm 0,00206				
HB x PAC	598	22	564	58	375	245	-	-	-
	167	01	143	15	111	53	-	-	-
$p \pm DP$	0,0399 \pm 0,00072		1,0000 \pm 0,00000		0,0999 \pm 0,00266				
RN x CBE	591	19	534	40	371	237	-	-	-
	218	04	143	07	127	91	-	-	-
$p \pm DP$	0,4709 \pm 0,00149		0,3595 \pm 0,00231		0,5160 \pm 0,00496				
RN x PN	591	19	534	40	371	237	-	-	-
	56	02	27	03	22	08	-	-	-
$p \pm DP$	0,7043 \pm 0,00085		0,4646 \pm 0,00131		0,2468 \pm 0,00216				
RN x PAC	591	19	534	40	371	237	-	-	-
	167	01	143	15	111	53	-	-	-
$p \pm DP$	0,0939 \pm 0,00101		0,3064 \pm 0,00251		0,1188 \pm 0,00337				
CBE x PN	218	04	143	07	127	91	-	-	-
	56	02	27	03	22	08	-	-	-
$p \pm DP$	0,6079 \pm 0,00081		0,3732 \pm 0,00115		0,1623 \pm 0,00175				
CBE x PAC	218	04	143	07	127	91	-	-	-
	167	01	143	15	111	53	-	-	-
$p \pm DP$	0,3951 \pm 0,00122		0,1233 \pm 0,00152		0,0698 \pm 0,00217				
PN x PAC	56	02	27	03	22	08	-	-	-
	167	01	143	15	111	53	-	-	-
$p \pm DP$	0,1614 \pm 0,00097		1,0000 \pm 0,00000		0,6695 \pm 0,00163				

PN = Pedras Negras; PAC = Pacientes; DP = Desvio Padrão.

Tabela 15. Diferenciação genotípica interpopulacional entre pares das amostras.

Pares Amostrais	CCR5			CYP2E1			GSTP1			ACPI				
	WT/WT	WT/WT	WT/WT	C1/C1	C1/C2	C2/C2	*A/*A	*A/*B	*B/*B	*A/*A	*A/*B	*A/*C	*B/*B	*B/*C
HB x RN	290	18	02	253	58	0	105	165	40	06	101	02	193	08
	286	19	0	247	40	0	101	169	34	10	94	02	185	08
<i>p ± DP</i>	0,7558 ± 0,0039			0,1183 ± 0,0056			0,9212 ± 0,0032			0,8451 ± 0,0042				
HB x CBE	290	18	02	253	58	0	105	165	40	-	-	-	-	-
	107	04	0	68	07	0	37	53	19	-	-	-	-	-
<i>p ± DP</i>	0,2877 ± 0,0049			0,0605 ± 0,0031			0,5508 ± 0,0075							
HB x PN	290	18	02	253	58	0	105	165	40	-	-	-	-	-
	27	02	0	12	03	0	09	04	02	-	-	-	-	-
<i>p ± DP</i>	1,0000 ± 0,00000			1,0000 ± 0,00000			0,1640 ± 0,0034							
HB x PAC	290	18	02	253	58	0	105	165	40	-	-	-	-	-
	83	01	0	64	15	0	33	45	04	-	-	-	-	-
<i>p ± DP</i>	0,0531 ± 0,0024			1,0000 ± 0,0000			0,0869 ± 0,0049							
RN x CBE	286	19	0	247	40	0	101	169	34	-	-	-	-	-
	107	04	0	68	07	0	37	53	19	-	-	-	-	-
<i>p ± DP</i>	0,3445 ± 0,0043			0,3368 ± 0,0047			0,4972 ± 0,0084							
RN x PN	286	19	0	247	40	0	101	169	34	-	-	-	-	-
	27	02	0	12	03	0	09	04	02	-	-	-	-	-
<i>p ± DP</i>	1,0000 ± 0,0000			0,7030 ± 0,0019			0,1503 ± 0,0036							
RN x PAC	286	19	0	247	40	0	101	169	34	-	-	-	-	-
	83	01	0	64	15	0	33	45	04	-	-	-	-	-
<i>p ± DP</i>	0,0615 ± 0,0018			0,2825 ± 0,0050			0,0973 ± 0,0046							
CBE x PN	107	04	0	68	07	0	37	53	19	-	-	-	-	-
	27	02	0	12	03	0	09	04	02	-	-	-	-	-
<i>p ± DP</i>	0,6030 ± 0,0017			0,3625 ± 0,0023			0,1301 ± 0,0032							
CBE x PAC	107	04	0	68	07	0	37	53	19	-	-	-	-	-
	83	01	0	64	15	0	33	45	04	-	-	-	-	-
<i>p ± DP</i>	0,3958 ± 0,0025			0,1074 ± 0,0029			0,0631 ± 0,0036							
PN x PAC	27	02	0	12	03	0	09	04	02	-	-	-	-	-
	83	01	0	64	15	0	33	45	04	-	-	-	-	-
<i>p ± DP</i>	0,1629 ± 0,0021			1,0000 ± 0,0000			0,6421 ± 0,0032							

PN = Pedras Negras; PAC = Pacientes; DP = Desvio Padrão.

Tabela 16. Diferenciação gênica intrapopulacional de indivíduos com e sem infecção por *Plasmodium* das Vilas de Candelária e Bate-Estaca, Porto Velho – RO.

Pares Amostrais	CCR5		CYPE1		GSTP1	
	WT	$\Delta 32$	C1	C2	GSTP1a	GSTP1b
Não x Sim	124	02	75	05	72	50
	94	02	68	02	55	41
$p \pm DP$	1,0000 \pm 0,0000		0,4498 \pm 0,00116		0,8907 \pm 0,00088	
<i>Falciparum</i> x <i>Vivax</i>	44	0	30	02	25	19
	27	01	20	0	16	12
$p \pm DP$	0,3878 \pm 0,00088		0,5179 \pm 0,00067		1,0000 \pm 0,0000	
<i>Falciparum</i> x Mista	44	0	30	02	25	19
	23	01	18	0	14	10
$p \pm DP$	0,3531 \pm 0,00087		0,5284 \pm 0,00061		1,0000 \pm 0,0000	
<i>Vivax</i> x Mista	27	01	-	-	16	12
	23	01	-	-	14	10
$p \pm DP$	1,0000 \pm 0,0000		-		1,0000 \pm 0,0000	

DP = Desvio Padrão.

Tabela 17. Diferenciação genotípica intrapopulacional de indivíduos com e sem infecção por *Plasmodium* das Vilas de Candelária e Bate-Estaca, Porto Velho – RO.

Pares Amostrais	CCR5			CYP2E1			GSTP1		
	WT/WT	WT/WT	WT/WT	C1/C1	C1/C2	C2/C2	*A/*A	*A/*B	*B/*B
Não x Sim	61	02	0	35	05	0	24	24	13
	46	02	0	33	02	0	13	29	06
$p \pm DP$	1,0000 \pm 0,0000			0,4399 \pm 0,0024			0,8920 \pm 0,0018		
<i>Falciparum</i> x <i>Vivax</i>	22	0	0	14	02	0	06	13	03
	13	01	0	10	0	0	04	08	02
$p \pm DP$	0,3884 \pm 0,0018			0,5053 \pm 0,0016			1,0000 \pm 0,0000		
<i>Falciparum</i> x Mista	22	0	0	14	02	0	06	13	03
	11	01	0	09	0	0	03	08	01
$p \pm DP$	0,3513 \pm 0,0018			0,5174 \pm 0,0016			1,0000 \pm 0,0000		
<i>Vivax</i> x Mista	13	01	0	-	-	-	04	08	02
	11	01	0	-	-	-	03	08	01
$p \pm DP$	1,0000 \pm 0,0000			-			1,0000 \pm 0,0000		

DP = Desvio Padrão.

4.5. Distribuição de Episódios de Malária

As amostras dos moradores das Vilas de Candelária e Bate-Estaca foram agrupadas de forma semelhante ao grupo de Mães, separados em grupos por malária falcípara, malária *vivax*, malária mista e indivíduos sem infecção. Nenhum fenótipo de malária pode ser atribuído como resultado de associação com qualquer loco analisado nesta Tese (tabela 18). As tabelas de 20 a 23 resumem estes resultados.

Tabela 18. Distribuição genotípica das Vilas de Candelária e Bate-Estaca segundo infecção *Plasmodium*.

<i>Sistema Genético</i>	<i>Malária falciparum</i>		<i>Malária vivax + mista</i>		<i>Sem Infecção</i>	
CCR5						
WT/WT	(22)		0,9231 (24)		0,9683 (61)	
WT/ Δ 32	(0)		0,0769 (02)		0,0317 (02)	
Δ 32/ Δ 32	(0)		0,0000 (0)		0,0000 (0)	
<i>Freq Al. Δ32</i>			0,0384		0,0159	
<i>p</i>			0,1616		0,1018	
CYP2E1						
C1/C1	0,8750 (14)		(19)		0,8750 (35)	
C1/C2	0,1250 (02)		(0)		0,1250 (05)	
C2/C2	0,0000 (0)		(0)		0,0000 (0)	
<i>Freq Al. C2</i>	0,0625				0,0625	
<i>p</i>	0,2102				0,3267	
GSTP1						
GSTPa/a	0,2727 (06)		0,2692 (07)		0,3934 (24)	
GSTPa/b	0,5909 (13)		0,6154 (16)		0,3934 (24)	
GSTPb/b	0,1364 (03)		0,1154 (03)		0,2132 (13)	
<i>Freq Al. *b</i>	0,4318		0,4230		0,4098	
<i>p</i>	0,6619		0,1839		0,1449	
GSTT1						
*1/*1 ou *1/*0	0,6250 (10)		0,7500 (15)		0,6153 (24)	
*0/*0	0,3750 (06)		0,2500 (05)		0,3846 (15)	
<i>Freq Al. *0</i>	0,6123		0,500		0,6201	

Tabela 19. Associação do loco CCR5 com variáveis de infecção por *Plasmodium* nas amostras dos bairros Candelária e Bate-estaca.

Infecção por <i>Plasmodium</i>	CCR5			Odds Ratio (IC 95%)
	N/N N = 107	N/Δ32 N = 04	<i>p</i>	
<i>Infecção</i>				
Presente	47	02	P = 1,0	0,7833
Ausente	60	02		(0,1063 a 5,772)
<i>Fenótipo de Infecção</i>				
Sintomática	20	02	0,1964	0,1491
Assintomática	27	0		(0,0067 a 3,278)
<i>Episódios de Infecção</i>				
Poucos (= 1)	09	01	0,3699	0,2368
Muita (> 1)	38	01		(0,01348 a 4,161)

Tabela 20. Associação do loco CYP2E1 com variáveis de infecção por *Plasmodium* nas amostras dos bairros de Candelária e Bate-estaca.

Infecção por <i>Plasmodium</i>	<i>CYP2E1</i>			<i>Odds Ratio</i> <i>(IC 95%)</i>
	C1/C1 N = 68	C1/C2 N = 07	<i>p</i>	
<i>Infecção</i>				
Presente	34	05	0,4329	0,4000
Ausente	34	02		(0,0725 a 2,207)
<i>Fenótipo de Infecção</i>				
Sintomática	13	01	P = 1,0	0,6190
Assintomática	21	01		(0,0355 a 10,783)
<i>Episódios de Infecção</i>				
Poucos (= 1)	08	0	P = 1,0	1,604
Muita (> 1)	26	02		(0,06984 a 36,828)

Tabela 21. Associação do loco GSTT1 com variáveis de infecção por *Plasmodium* nas amostras dos bairros de Candelária e Bate-estaca.

Infecção por <i>Plasmodium</i>	<i>GSTT1</i>			<i>Odds Ratio</i> (IC 95%)
	Positivo N = 49	Negativo N = 26	<i>p</i>	
<i>Infecção</i>				
Presente	25	11	0,6277	1,420
Ausente	24	15		(0,5445 a 3,706)
<i>Fenótipo de Infecção</i>				
Sintomática	11	05	P = 1,0	0,9429
Assintomática	14	06		(0,2266 a 3,924)
<i>Episódios de Infecção</i>				
Poucos (= 1)	04	04	0,2137	0,3333
Muita (> 1)	21	07		(0,0653 a 1,700)

Tabela 22. Associação do loco GSTP1 com variáveis de infecção por *Plasmodium* nas amostras dos bairros de Candelária e Bate-estaca.

Infecção por <i>Plasmodium</i>	<i>GSTP1</i>			<i>Odds Ratio</i> (IC 95%)
	*A/*A e *A/*B N = 90	*A/*B N = 19	<i>p</i>	
<i>Infecção</i>				
Presente	43	06	0,2168	1,982
Ausente	47	13		(0,6921 a 5,678)
<i>Fenótipo de Infecção</i>				
Sintomática	19	03	P = 1,0	0,7917
Assintomática	24	03		(0,1432 a 4,378)
<i>Episódios de Infecção</i>				
Poucos (= 1)	09	01	P = 1,0	1,324
Muita (> 1)	34	05		(0,1368 a 12,809)

5. DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO POPULACIONAL DE RONDÔNIA

Mistura Étnica

O Brasil é um país caracterizado pelo seu alto índice de miscigenação, compondo assim uma das populações mais heterogêneas do mundo, como resultado de uma formação, principalmente representada por portugueses, escravos africanos e ameríndios (Parra e cols., 2002; Salzano e cols., 1999; Krieger e cols., 1965). Em 2007, segundo o IBGE, a população brasileira era composta por cerca de 49,5% de indivíduos pardos ou negros e 50% de indivíduos brancos, e o estado de Rondônia composto por cerca de 64% de indivíduos pardos ou negros e 35% de indivíduos brancos.

Com esta diversidade, numa população originada e mantida por ondas migracionais, em qualquer estudo envolvendo associações com doenças faz-se necessário delimitarem-se os parâmetros que podem causar vieses na estrutura populacional, levando a resultados pouco precisos sobre suscetibilidade ou resistência de um dado gene a uma dada doença (Driss e cols., 2011; Sinha e cols., 2008; Marchini e cols., 2004).

Nesta pesquisa envolvendo uma doença endêmica, Malária, em Rondônia, Amazônia Ocidental brasileira, foram analisados cinco grupos representativos da população deste estado situado no Noroeste do Brasil. O padrão étnico dos indivíduos destas cinco amostras, determinado por duas entrevistadoras, no momento da coleta do material biológico, (tabela 02), foi semelhante ao observado em outras regiões do país: triétnico, variando a proporção de indivíduos negros, brancos e ameríndios segundo a história de povoamento da região em que foi coletada a amostra (Farias e cols., 2012).

Na amostra do Hospital de Base, as 315 mulheres participantes da Pesquisa tinham médiade idade igual a 23 anos, com os limites de 18 e 43 anos. A proporção étnica observada em relação a cor da pele e/ou traços físicos foi de 74,92% (236/315) de mulato, 19,68% (62/315) de brancos e 5,08% (16/315) de negros e apenas 0,32% de amarelos, sendo que uma das mulheres apresentava características indígenas (tabela 02). A amostra de 315 de bebês RN apresentou 0,95% (255/315) de mulatos, 17,15% (54/315) de brancos, 0,95% (03/315) de negros e 0,95% (03/315) de amarelos.

Em 2005, Jano e cols. realizaram uma análise de ancestralidade através do MtDNA nas amostras de Mães e Cantanhede e cols. (2010) estenderam esta análise para a amostra de Recém-nascidos. Em ambas as análises, como se esperava, a proporção de Ameríndios foi a mais alta, na casa dos 64%. Bem diferente do obtido por identificação baseada na cor da pele.

O comprometimento visual da caracterização pela cor da pele pode ter sido influenciado por fatos históricos e culturais da população brasileira. No Brasil, a cor da pele geralmente é usada como um indicativo de categoria social do indivíduo, e a frequência de casamentos inter-raciais têm propiciado o “embranquecimento” da população brasileira, observado em análises com marcadores genéticos (Andrade-Casseb e cols., 2008; Engracia, 1972; Krieger e cols., 1966). A subjetividade na classificação é generalizada, e quando se trata de auto-denominação, quase sempre o indivíduo tende a um “branqueamento”. A abolição da escravidão no Brasil ocorreu de forma relativamente pacífica, sem gerar conflitos étnicos ou dominação racial institucionalizada por lei. Após 1888, a História da escravidão foi reconstruída sob uma perspectiva mais idealista, mesmo se os dados e documentos históricos revelassem uma realidade bem menos confortável. Como exemplo, Ruy Barbosa, quando Ministro das Finanças, mandou queimar todos os registros sobre escravidão existentes em arquivos nacionais, numa tentativa de apagar um passado e começar uma nova etapa (Schwarcz, 1998, para revisão).

Outro fato que provavelmente contribuiu para o resultado obtido, é que o Hospital de Base de Porto Velho, local de coleta, recebe pessoas de baixo poder aquisitivo tanto da capital como do interior do estado, além de prestar atendimento a pacientes oriundos de Humaitá, cidade próxima a Porto Velho, mas pertencente ao estado do Amazonas que se caracteriza por apresentar um alto índice de mistura indígena, desde que é um estado que envolve grande parte da Amazônia Ocidental Brasileira. Vale ressaltar ainda que o Hospital de Base, no período de coleta, era o único hospital público responsável pelo atendimento de mães da capital com um centro especializado em atendimento neonatal, e, com exceção de algumas clínicas particulares, realizava todos os atendimentos de pessoas de baixa renda.

Também foi observado que cerca de 56,83% (179/315) destas mulheres eram originárias do próprio estado de Rondônia e 25,4% oriundas de outros estados da Região Norte; apenas 3,8% e 1,9% eram originárias das Regiões Sul e Sudeste do país, e 7,94% e 4,13%, das regiões Nordeste e Centro-Oeste, respectivamente.

No bairro de Candelária e Bate-Estaca os moradores foram caracterizados em sua maioria como mulatos, correspondendo a cerca de 62,16% (69/111) das amostras sem parentesco, sendo seguidos por brancos e negros, 31,53% (35/111) e 6,31% (07/111), respectivamente (tabela 02). A amostra de Bate-Estaca apresentou uma proporção maior de crianças (0 a 15 anos, 41,1%), seguido por jovens (16 a 30 anos, 32,9%) e adultos (acima de 31 anos, 26%). Em Candelária a maior proporção foi de jovens (34,7%), seguido de adultos (33,8%) e crianças (31,6%).

Como o esperado, por sua ascendência quilombola, os indivíduos, sem parentesco, do vilarejo de Pedras Negras apresentaram composição de negros igual a 21,95% (esta foi a maior proporção de indivíduos negros observada neste trabalho), 63,41% de mulatos e 14,64% de brancos (tabela 02).

Pela análise de frequências gênicas e genótípicas da amostra de mães, de acordo com sua classificação étnica (tabela 08), pode ser observado pelo método de Fisher ($p = 0,0017$) há um desequilíbrio quanto à aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Fica evidenciada a margem de erro quando se realiza a classificação étnica pelo método visual. Também se pode observar que o grupo amostral de recém-nascidos não adere ao modelo do Teorema de Hardy-Weinberg, evidência obtida na análise do loco GSTP1 entre os indivíduos classificados como mulatos ($p = 0,0058$; tabela 09). Outro loco que não apresentou equilíbrio de H-W segundo o método de Fisher foi o loco da ACP1 em todas as classes étnicas do grupo de recém-nascidos ($p = 0,0105$; $p = 0,0071$; $p = 0,0067$ e $p = 0,0000$; tabela 09).

Não foi possível realizar as análises por classificação étnica da amostra formada por indivíduos que procuravam pelo posto de atendimento de pesquisa de *Plasmodium* em Porto Velho, localizado no CEPEN-CEMETRON desde que estas amostras foram obtidas em colaboração com outro projeto de pesquisa em malária, no qual não foi averiguada a classificação étnica deste grupo amostral.

Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências gênicas e genotípicas obtidas neste trabalho foram estimadas por contagem direta para testar a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando o nível de significância de 0.05 (tabelas 03 a 06). Os locos analisados foram os dos genes CCR5, CYP2E1, GSTP1, GSTT1 e ACP1, como descritos nos objetivos.

Loco CCR5

Considerando o gene CCR5, a deleção CCR5 Δ 32 é tida como um marcador racial, sendo datado com origem recente de cerca de 7.000 anos (Lidén e cols., 2006). O alelo CCR5 Δ 32 é comum na América do Norte e Europa, com heterozigose variando de 10 a 20% entre caucasianos (Martinson e cols., 1997; Dean e cols., 1996; Huang e cols., 1996; Liu e cols., 1996; Samson e cols., 1996). Na Europa e Ásia, as frequências desta mutação mostram um gradiente norte-sul, com frequências maiores em populações filandesas e também entre mordvinianos (16%), uma população indígena da Rússia, apresentando-se menores na Sardenha (4%) (Libert e cols., 1998). O alelo CCR5 Δ 32 possui uma frequência de 0,092 em populações caucasianas, mas está ausente em populações negras da Europa Ocidental, África Central e em populações Japonesas. (Samson e cols., 1996). A frequência do alelo mutante varia entre os caucasianos europeus, revelando um declínio desde o Norte até o Sul, alcançando níveis imperceptíveis na Arábia Saudita (O'Brien e Dean, 1997).

A frequência observada do alelo CCR5 Δ 32 na amostra HB mães foi de 3,5%, com o valor de p igual a 0,0477 (tabela 03), evidência de que este loco, neste grupo amostral, não adere às condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estas frequências alélicas são semelhantes às observadas por Passos e Picanço (1998) em populações urbanas de São Paulo, sudeste brasileiro, e menores que as descritas por Libert e cols. (1998) em população portuguesa (6,4%), cuja distribuição é considerada relativamente baixa quando comparada a outras regiões da Europa.

Populações urbanas tendem a ser mais miscigenadas do que as populações em outras áreas, levando a uma diminuição na frequência do alelo CCR5 Δ 32 mesmo em regiões onde a contribuição europeia é maior, como a região sul do Brasil (Vargas e cols., 2006; Passos e Picanço, 1998). O primeiro relatório brasileiro de indivíduos homozigotos para o alelo CCR5 Δ 32 foi fornecido por Grimaldi e cols. (2002), que observou que a frequência desse alelo variou de acordo com a etnia enquanto investigava sua ocorrência em vários grupos étnicos de diferentes regiões do Brasil. Ao analisar a distribuição de diversos alelos do gene CCR5 em populações do sul do Brasil, Boldt e cols. (2009) relataram a presença de três indivíduos homozigotos para o alelo CCR5 Δ 32 entre Euro-Brasileiros. A frequência deste alelo em heterozigose nas populações analisadas foi compreendida em 15,1% entre Euro-Brasileiros, 4,1% entre Afro-Brasileiros e de 0,9% entre ameríndios Guarani, sendo ausente entre Orientais-Brasileiros e ameríndios Kaingang.

É possível avaliar a influência da população europeia na constituição genética de outras populações brasileiras com base na frequência do alelo CCR5 Δ 32 (tabela 23). É constatado que a frequência deste alelo tende a diminuir do Sul para o Norte em virtude da diferença da influência europeia na população brasileira (Carvalho e cols., 2004). Esta tendência foi também observada na amostra de mães do Hospital de Base (tabelas 04 e 23), em que duas mães foram homozigotas para a mutação Δ 32 (CCR5 Δ 32/CCR5 Δ 32). Segundo Grimaldi e cols. (2002), as frequências de CCR5 Δ 32 refletem a mistura étnica, em geral tri-racial, da população brasileira. Como consequência desta distribuição diferencial, observadas em populações mistas, as frequências de CCR5 Δ 32 podem ser usadas como um indicador de contribuição caucasóide para populações miscigenadas (Carvalhaes e cols., 2004).

Tabela 23. Frequências alélicas de CCR5 Δ 32 em diferentes populações brasileiras.

<i>População</i>	<i>Região ou Estado</i>	<i>N</i>	<i>Δ32/Δ32</i>	<i>Δ32</i>	<i>Referência</i>
Ameríndios	Região Sudeste	98	0	Nula	Passos e Picanço, 1998
Ameríndios	Região Norte	401	0	Nula	Grimaldi e cols., 2002
Ameríndios	Região Sul	108	0	Nula	Hünemeier e cols., 2005
Ameríndios	Paraná	160	0	Nula	Boldt e cols., 2009
CEPEM	Porto Velho, RO	84	0	0,006	Presente trabalho
Afro-Brasileiros	Pará	67	0	0,007	Carvalhaes e cols., 2004
Afro-Brasileiros	Bahia	53	0	0,009	Carvalho e cols., 2004
CBE	Porto Velho, RO	111	0	0,018	Presente trabalho
Afro-Brasileiros	Rio de Janeiro, RJ	54	0	0,019	Chies e Hutz, 2003
Afro-Brasileiros	Paraná	172	0	0,020	Boldt e cols., 2009
Ameríndios	Região Sul	47	0	0,020	Hünemeier e cols., 2005
Ameríndios	Região Sul	71	0	0,030	Hünemeier e cols., 2005
Urbana	Belém, PA	394	01	0,030	Carvalhaes e cols., 2004
Recém-nascidos	Porto Velho, RO	305	0	0,031	Presente trabalho
Pedras Negras	Vale do Guaporé, RO	29	0	0,034	Presente trabalho
Mães	Porto Velho, RO	310	02	0,035	Presente trabalho
Urbana	Ribeirão Preto, SP	100	0	0,035	Passos e Picanço, 1998
Ameríndios	Paraná	114	0	0,040	Boldt e cols., 2009
Euro-Brasileiros	Porto Alegre, RS	102	0	0,044	Chies e Hutz, 2003
Caucasianos	Paraná	120	01	0,050	Muxel e cols., 2008
População saudável	Região Sudeste	324	0	0,054	Pereira e cols., 2000
Afro-Brasileiros	Alegrete, RS	13	0	0,064	Vargas e cols., 2006
Euro-Brasileiros	Joinville, SC	99	01	0,065	Grimaldi e cols., 2002
Euro-Brasileiros	Alegrete, RS	59	0	0,068	Vargas e cols., 2006
Afro-Brasileiros	Porto Alegre, RS	58	0	0,080	Chies e Hutz, 2003
Euro-Brasileiros	Paraná	172	03	0,093	Boldt e cols., 2009

Na amostra de recém-nascidos a frequência do alelo CCR5 Δ 32 foi de 3,1% (heterozigose de 6% ou 19/305 dos indivíduos desta subamostra; tabela 03). As populações ribeirinhas (periurbanas) de Porto Velho, representadas neste trabalho pelas amostras Candelária e Batestaca, são constituídas por indivíduos oriundos dos primeiros ciclos migratórios, principalmente barbadianos e nordestinos (Pinto, 1993). A frequência da mutação CCR5 Δ 32 foi inferior à do grupo do Hospital de Base (1,8%, $p = 1,0$; tabela 04). Este alelo foi observado apenas em indivíduos heterozigotos e sua baixa frequência já era esperada desde que a região reflète a história de fixação de população negra nestas localidades, assim como miscigenação com comunidades indígenas presentes na época das primeiras colonizações nas regiões ribeirinha do rio Madeira (Ferreira, 1987).

Em nossas análises, o alelo CCR5 Δ 32 esteve presente com frequência de 0,034. A ocorrência deste alelo em uma comunidade remanescente de Quilombos indica a presença de genes europeus na região, o que é comprovado pela história de povoamento do Vale do Guaporé (Teixeira, 2004). Este fato ficou evidente com a presença desta mutação na população Quilombola do Vale do Guaporé, e em mães de etnia Mulata, do Hospital de Base de Porto Velho. Também em Bate Estaca e Candelária, populações que se originaram pela migração de indivíduos Negros e pela presença do Índio nativo da Região. As frequências relativamente altas, que não diferem do total da População Brasileira, dado a origem destas populações, refletem a presença de genes europeus nos indivíduos que compõem a população de Rondônia.

Loco CYP2E1

A distribuição dos alelos do gene CYP2E1 nas amostras analisadas está de acordo com as condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg não sendo observadas diferenças estatisticamente significantes (tabela 04). Os resultados obtidos mostram que o alelo CYPE1*5B (C2) apresentou frequências semelhantes entre os grupos de mães, Pedras Negras e Pacientes, frequências estas semelhantes às observadas por Rossini e cols. (2006) em indivíduos brancos e não brancos do Rio de Janeiro, em que cerca de 85% da população (branca e não branca) foi homozigota para o alelo selvagem. O alelo

*5B é significativamente mais frequente entre brancos (0,07) do que entre indivíduos não brancos (0,03; $P < 0,05$). Diferenças nas frequências alélicas de CYP2E1*5B entre indivíduos brancos e não brancos foram também mostradas em norte-americanos (Stephens e cols., 1994; Liu e col., 2001). A população de recém-nascidos apresentou frequência de 6,96% do alelo C2, enquanto a amostra constituída pelos moradores das vilas de Candelária e Bate-Estaca apresentou cerca de 4,7%, menor do que as frequências observadas nos outros grupos amostrais e também por Rossini e cols. (2006) no Rio de Janeiro. Estes resultados sugerem que o alelo C2 é mais frequente na população brasileira em indivíduos de populações ocidentais do que em populações asiáticas e ameríndios. A frequência deste alelo foi de 0,03 a 0,04 em populações da Alemanha e entre Euro-americanos, e 0,003 - 0,01 em Afro-americanos (Liu e cols., 2001; Stephens e cols., 1994). Entre indivíduos tailandeses, as frequências dos genótipos 1A/*1A, *1A/*5B, e *5B/*5B foram 58, 35,1 e 6,9%, respectivamente (Wang e cols., 1999), com uma frequência alélica de 0,24 para o alelo *5B (C2). Em indivíduos chineses, a frequência de genótipos homozigotos para o alelo selvagem foi de 6% (Gao e cols., 2002; Tan e cols., 2000).

Loco GSTP1

A distribuição genotípica do loco GSTP1 foi homogênea entre os grupos amostrais (tabela 05). A análise de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg das populações de Mães ($p = 0,0571$), Recém-nascidos ($p = 0,0038$) e de Pacientes ($p = 0,0409$) mostra que foram observadas diferenças estatisticamente significantes em nível de 5%. O genótipo mais frequente, observado entre os grupos amostrais, foi de heterozigoto, com exceção entre os indivíduos da amostra de Pedras Negras, em que o genótipo mais frequente foi o homozigoto GSTP1a com frequência de 60% dos indivíduos análises (09/15), seguido por 26,67% (4/15) de heterozigotos e pelo homozigoto GSTP1b com 13,33% (2/15). Migração, responsável por intenso fluxo gênico nesta região estudada por nós, evidenciado pelo excesso de heterozigotos nestas amostras, pode ser um dos fatores responsáveis pelos resultados observados. O alelo

GSTP1a foi o mais frequente em todas as amostras analisadas. Este alelo é a variante mais comum em caucasianos. A variante GSTP1b é menos frequente, com < 15% de genótipos de caucasianos (Ali-Osman e cols., 1997). Esse resultado pode ser reflexo dos ciclos migratórios que influenciaram a formação da população rondoniense, com um intenso fluxo gênico nesta população, bem como a presença de grande pressão seletiva desde o início de sua colonização com endemias de várias doenças parasitárias, principalmente a malária. Assim as frequências gênicas e genotípicas são influenciadas por fatores evolutivos como mutação, migração e seleção natural. Paralelamente, as frequências genotípicas são afetadas por flutuações estatísticas que ocorrem em todas as populações ou pequenos grupos amostrais (Hartl, 2000).

Na amostra de Candelária e Bate-Estaca (CBE), 33,95% (37/109) desta amostra, foram homozigotos GSTP1a, 48,62% (53/109) heterozigotos e 17,43% (19/109) homozigotos GSTP1b. Os Alelos, GSTP1a e GSTP1b, apresentaram frequência de 0,583 e 0,417, respectivamente, sendo esta a única amostra a estar em equilíbrio com as condições do Teorema de Hardy-Weinberg.

A amostra hospitalar, urbana, de mães (HB) apresentou 33,87% (105/310) de indivíduos homozigotos para o alelo GSTP1a, 53,23% (165/310) de heterozigotos GSTP1a/GSTP1b e 12,90% (40/310) de homozigotos GSTP1b. As frequências alélicas para o loco gênico GSTP1 foram de 0,605 e 0,395 para os alelos GSTP1a e GSTP1b, respectivamente. Os resultados observados na amostra Recém-nascidos (RN) foram semelhantes aos da amostra de mães. A amostra de Recém-nascidos apresentou 33,22% (101/304) de indivíduos homozigotos para o alelo GSTP1a, 55,60% (169/304) de heterozigotos GSTP1a/GSTP1b e 11,18% (34/304) de homozigotos GSTP1b. As frequências alélicas para neste grupo amostral foram de 0,611 e 0,389 para os alelos GSTP1a e GSTP1b, respectivamente. A frequência do alelo GSTP1a nas duas amostras, mães e recém-nascidos, foi de 0,605 e de 0,611, respectivamente.

Em indivíduos infectados por malária (pacientes do CEPEN; tabela 05), pode-se observar as proporções observadas foram de aproximadamente 40,24% (33/82) de indivíduos homozigotos para o alelo GSTP1a, 54,88% (45/82) de heterozigotos GSTP1a/GSTP1b e uma significativa redução de indivíduos homozigotos para o alelo GSTP1b em relação às outras amostras com cerca de 4,88% (4/82), e frequências gênicas

de 0,677 e 0,323 para os alelos GSTP1a e GSTP1b, respectivamente. A frequência do alelo GSTP1b nesta amostra foi menor do a observada na amostra de Candelária e Bate-Estaca e similares às de Mães e Recém-nascidos, no entanto, foi maior do que a frequência observada em Pedras Negras.

As frequências das variantes GSTP1a e GSTP1b não estão distribuídas aleatoriamente em todas as populações, mas seguem padrões étnicos e/ou geográficos, em que o alelo GSTP1a é comumente encontrado nas populações africanas e asiáticas e o alelo GSTP1b, em indivíduos caucasianos europeus (Abbas e cols., 2004; Ishii e cols., 1999; Watson e cols., 1998). A mutação do códon 105 é muito mais frequente que a mutação no códon 114, muitas vezes rara, e sua ocorrência em grupos étnicos distintos pode sugerir que ambas as mutações ocorreram antes da divergência dos principais grupos étnicos (Board e cols., 1998). Em nossas análises observamos que o alelo GSTP1a foi o mais frequentes em todas as etnias. Esta distribuição de frequências segue os padrões de miscigenação da população brasileira. Os dados de distribuição deste gene na população brasileira ainda são escassos. Na população do Rio de Janeiro, o alelo GSTP1a, em indivíduos caucasoides e não caucasoides, teve frequência de 0,683 e de 0,691, respectivamente, sendo a do alelo GSTP1b de 0,317 e 0,309, respectivamente (Rossini e cols., 2002). Leichsenring e cols. (2006) observaram em indivíduos de amostra de Curitiba, Paraná, que não houve diferenças significantes nas frequências deste alelo entre as etnias dos indivíduos analisados. A frequência do alelo GSTP1a encontrada foi de 0,68 e para o alelo GST1b de 0,32. Os autores concluíram que apesar de o estado do Paraná ter sido colonizado por imigrantes europeus, a miscigenação de grandes cidades diminuiu a frequência deste gene na população.

Loco GSTT1

Os indivíduos foram analisados como GSTT1-positivos (presença da proteína) e negativos (GSTT1-nulo), para os que não apresentaram atividade gênica. Os fenótipos observados foram Positivo que compreende os genótipos homozigoto *1/*1 e heterozigoto *1/*0, e Negativo quando genótipo homozigoto *0/*0. As frequências

gênicas e fenotípicas foram estimadas usando os princípios da Lei de Hardy-Weinberg, e segundo estes parâmetros, observamos que a distribuição fenotípica de indivíduos GSTT1-nulo não foi homogênea entre as amostras analisadas (tabela 06).

A amostra de mães (HB) apresentou frequências fenotípicas de 82,3% (251/305) de indivíduos GSTT1-positivo e 17,7% (54/305) de indivíduos GSTT1-negativo, com estimativa de frequência do alelo nulo foi de 0,420. Os resultados observados na amostra Recém-nascidos (RN) foram semelhantes aos da amostra de mães com um pequeno aumento no índice de indivíduos negativos e decréscimo de positivos. Esta amostra apresentou frequências fenotípicas de 75,58% (226/299) de indivíduos GSTT1-positivo e 24,4% (73/305) de indivíduos GSTT1-negativo. A estimativa de frequência do alelo nulo foi de 0,494. Estas duas amostras apresentaram os menores índices de GSTT1-negativo entre as amostras analisadas, compreendendo 42 e 49% dos indivíduos analisados para mães e recém-nascidos, respectivamente.

As amostras das vilas de Candelária e Bate-Estaca (CBE) e da vila de Pedras Negras (PN) apresentaram frequências do alelo nulo aproximadas de 58 e 68%, respectivamente. A amostra de CBE apresentou frequências fenotípicas de 65,33% (49/75) de indivíduos GSTT1-positivo e 34,66% (26/75) de indivíduos GSTT1-negativo, e sua estimativa de frequência do alelo nulo foi de 0,588. Em Pedras Negras as frequências fenotípicas tiveram proporções semelhantes de indivíduos positivos e negativos proporcionalmente. Os resultados observados nesta amostra foram de 52,94% (09/17) de indivíduos GSTT1-positivo e 47,06% (08/17) de indivíduos GSTT1-negativo para frequências fenotípicas. A estimativa de frequência do alelo nulo foi de 0,686.

A frequência amostral mais alta observada, neste trabalho de Tese, foi a da amostra composta por pacientes com infecção por *Plasmodium*, com quase 72% dos pacientes com fenótipo GSTT1-nulo. Nesta amostra foi observado frequências fenotípicas de 48,57% (17/35) de indivíduos GSTT1-positivo e 51,43% (18/35) de indivíduos GSTT1-negativo, com estimativa de frequência do alelo nulo foi de 0,717. O índice elevado do alelo nulo (identificado apenas pelo fenótipo homozigoto, mas presente também em estado heterozigoto, em indivíduos classificados como fenótipo Positivo). Esta discussão é apresentada no Tópico de Relações Patógeno-Hospedeiro, mais a frente pode ter sido devido à natureza desta amostra, hospitalar, de indivíduos

portadores de infecção por Plasmódio. Estes dados são discutidos à frente, quando analisamos a associação entre patógenos e hospedeiro humano. As frequências de fenótipo nulo de GSTT1 não estão distribuídas aleatoriamente entre diferentes populações. Tem sido observado em muitos estudos que as frequências alélicas de genes metabólicos não são randomicamente distribuídas nas populações humanas, mas seguem padrões específicos a modelos étnicos e/ou geográficos (London e cols., 2000; Weber, 1999; Garte, 1998; Watson e cols., 1998). Garte e cols. (2001) analisaram estes padrões de distribuição de diversos polimorfismos de genes de metabolismo, em dados de populações caucasianas, asiáticas e africanas. Na população espanhola é verificada uma proporção de 23,1% do gene GSTT1. Os países escandinavos (Dinamarca, Finlândia e Suécia) apresentam uma baixa frequência da deleção do gene GSTT1 30% a menos que outras populações caucasianas, na população japonesa foi detectada a menor frequência da deleção de GSTT1 em relação a outros países asiáticos e a população chinesa apresentou uma distribuição de 51% (Ladero e cols., 2006; Garte e cols., 2001; Mukanganyama e cols., 1997).

Loco ACP1

Somente as amostras de mães e recém-nascidos foram analisadas para este loco gênico. A distribuição das frequências gênicas e genotípicas de ACP1 apresentou aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, distribuindo-se homogeneamente entre os grupos amostrais. O alelo *B foi o mais frequente com frequências gênicas de 0,7983 e 0,7893 para mães e recém-nascidos, sendo seguido mostra por pelos alelos ACP1*A (0,1854 e 0,1939) e ACP1*C (0,0161 e 0,0167), como a tabela 07. A distribuição genotípica do loco da ACP1 foi homogênea nas duas amostras, sendo o genótipo mais frequente o ACP1*B/ACP1*B com frequências de 62,25% (193/310) na amostra de mães e 61,87% (185/299) na amostra de Recém-nascidos, sendo seguido pelo genótipo ACP1*A/ACP1*B com frequências de 32,58% (101/310) na amostra de mães e 31,43% (94/299) na amostra de Recém-nascidos. Hopkinson e cols. (1963) descreveram um

polimorfismo humano envolvendo fosfatase ácida eritrocitária (EC 3.1.3.2). Três alelos, *A, *B e *C, estão envolvidos, suas frequências são estimadas em 0,35, 0,60 e 0,05, respectivamente (tabela 24). Diferenças significantes entre as isoformas *f* e *s* têm sido observadas em propriedades enzimática e molecular sugerindo que ela realiza diferentes funções fisiológicas (Stefani e cols., 1993). Em populações brancas, seis genótipos estão presentes com total atividade enzimática aumentando na ordem $*A/*A < *A/*B < *A/*C \leq *B/*B < *C/*B < *C/*C$.

A distribuição dos alelos da ACP1 está descrita em diversas populações, sendo o alelo ACP1*B o mais frequente na maioria das populações já estudadas (Guerra e cols., 2008; Wilder e Hammer, 2004, ver tabela 24). Sua frequência em populações africanas é elevada variando de 75% em Pigmeus da África Central (Vergnes e cols., 1980; Santachiara-Benerecetti e cols., 1977) a 100% em nativos da tribo de Kel Kumer na Nigéria (Santachiara-Benerecetti, 1980). No continente americano sua frequência varia de 58% em caucasoides dos Estados Unidos (Goedde, 1972; Budowle e cols., 1985) e 99% em indígenas bolivianos (Vergnes e cols., 1976). Na Ásia, a frequência deste alelo é bastante variável, principalmente entre os indianos, com frequências que variam de 57 a 93% (Farabegoli e cols., 1990). Em populações europeias o alelo ACP1*C é encontrado com baixa frequência variando de cerca 4 a 12% em caucasianos, sendo o homozigoto ACP1*C/ACP1*C considerado relativamente raro nestas populações (Martins e cols., 2008; Bottini e cols., 2004; Wilder e Hammer, 2004; Mourant e cols., 1976). As frequências deste alelo em 67 populações europeias foram distribuídas e foi obtida uma frequência média de 0,052 (Wilder e Hammer, 2004).

Tabela 24. Distribuição de frequência dos alelos de ACP1 em Europeus, Africanos Sub-Saarianos, portugueses e Ameríndios brasileiros.

Alelo	Africanos Sub-Saarianos (1,3,4,5)	Europeus (1,2,4,5)	Portugueses (1,2,3)	Ameríndios Brasileiros (2,4)
ACP1*A	0,196	0,328	0,358	0,114
ACP1*B	0,780	0,630	0,522	0,886
ACP1*C	0,009	0,042	0,120	0,000
ACP1*R	0,015	0,000	0,000	0,000

1 Giblett, 1969; 2 Roychoudhury e Nei, 1988; 3 Parra e cols., 1995; 4 Bortolini e cols., 1995; 5 Franco, 1980.

A distribuição dos alelos de ACP1 na população brasileira um padrão semelhante de outras populações, como já exposto acima. Souza e cols. (2003), analisando amostras de duas comunidades de Santa Catarina descendentes de imigrantes oriundos de Açores, descreveram as frequências dos alelos de ACP1, e foram semelhantes às frequências observadas em diversas populações europeias, com alelo ACP1*B apresentando frequências de 0,591 e 0,602 nestas comunidades, e o alelo ACP1*A com frequências de 0,323 e 0,332. Engracia e cols. (1990) analisaram diversos sistemas genéticos em Bambuí, Minas Gerais, uma área endêmica para Doença de Chagas, e descreveram uma frequência de 0,797 do alelo ACP1*B e 0,203 para o alelo ACP1*A. Semelhante às frequências observadas em Minas Gerais, Sampaio (1984) analisou uma amostra hospitalar urbana de mães e recém-nascidos em Ribeirão Preto, São Paulo, sendo a frequência do alelo ACP1*B correspondente a 0,748 e 0,750 em mães e recém-nascidos, respectivamente, e do alelo ACP1*A de 0,252 e 0,250. Os resultados obtidos nesta Tese para as amostras de Mães e Recém-nascidos (tabela 07) não diferem significativamente dos dados acima evidenciados, e assim seguindo os padrões de frequência tanto de populações brasileiras como de outras populações com frequências mundialmente estabelecidas.

ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL DE RONDÔNIA

A estrutura da população interfere muitas vezes nas análises de associação, causando viés nos resultados estatísticos. Desde que Rondônia tem uma história de povoamento em que várias ondas migratórias contribuíram para a formação da atual população, realizamos análises neste sentido, principalmente para conhecermos sua composição genética e evitarmos superposição de resultados.

Diferenciação Genética de Populações de Rondônia

Os testes de diferenciação genética populacional foram realizados par a par entre todas as amostras populacionais (tabelas 14 a 15) e entre subgrupos amostrais segundo infecção ou não por *Plasmodium* (tabelas 16 e 17).

A diferenciação gênica foi realizada com o teste exato de Fisher assumindo-se que a distribuição gênica entre as populações é estatisticamente semelhante, comparando cada loco em pares de populações ou subpopulações, a fim de determinar se existem diferenças nas frequências alélicas observadas (tabelas 14 e 16). Entre os pares analisados apenas o par HB x PAC (Mães e pacientes com infecção por *Plasmodium*) apresentaram resultado estatisticamente significativo ($p = 0,0399$; tabela 14), não existindo diferenças estatísticas significantes na distribuição das frequências gênicas dos outros pares analisados.

As análises de diferenciação genotípica foram realizadas com o teste exato G (Goudet e cols., 1996) que possui o mesmo princípio do teste de Fisher e testa a hipótese nula em que a distribuição genotípica é idêntica entre as populações (tabelas 15 e 17). Nenhuma dos pares populacionais analisados apresentou resultado estatisticamente significativo.

Determinação da Estimativa de Heterozigotos

A medida de união aleatória de gametas foi usada para obter a estimativa de excesso ou deficiência de heterozigotos (tabelas 12 e 13) nas amostras analisados a partir dos resultados dos locos CCR5, CYP2E1, GSTP1 e ACP1 (apenas nas amostras de mães e recém-nascidos).

Com esta estimativa, notamos que alguns sistemas genéticos apresentavam excesso de heterozigotos. Especificamente na amostra de Mães os sistemas com significância estatística foram GSTP1 e ACP1, com respectivos valores de p 0,0415 e 0,0316, respectivamente. Outra amostra que apresentou alta significância estatística para excesso de heterozigotos foi o de Recém-nascidos para o loco ACP1, com p value de 0,0024 (tabela 12). Estes resultados corroboram com os já apresentados nas tabelas 05 e 07 referentes às frequências genotípicas destes sistemas que apresentam proporções fenotípicas e genotípicas de heterozigotos maiores que homozigotos, e que não diferem significativamente do observado em outras populações brasileiras tanto para o loco GSTP1 (Rossini e cols., 2007; Gaspar e cols., 2004; Rossini e cols., 2002) quanto para o loco ACP1 (Souza e cols., 2003; Sampaio, 1984).

Quanto à estimativa de deficiência de heterozigotos somente na amostra de Mães pode-se observar estatística significativa no loco CCR5, com estimativa de $p = 0,0041$ (tabela 13); este resultado também está de acordo com os apresentados na tabela 03. A presença da mutação CCR5 Δ 32 em homozigose, em duas mulheres da amostra Mães, deve ter contribuído para a significância observada ($\chi^2 = 7,136$; $p = 0,0477$; tabela 03).

A não adequação destes resultados ao parâmetro estimado segundo as condições de Hardy-Weinberg pode ser devida à estrutura da população, oriunda de várias ondas migratórias e à preferência, já discutida anteriormente, de casamentos inter-étnicos, ou à segregação, não analisada, de alelos de transmissão preferencial neste loco gênico. Os demais grupos amostrais não apresentam excesso ou deficiência de heterozigotos permanecendo estatisticamente em equilíbrio.

Ao considerar o ponto de vista evolutivo, o excesso de heterozigotos pode ser explicado como um efeito seletivo contra homozigotos embora os polimorfismos

analisados não possuam efeito deletério. Deve-se considerar que algumas alterações enzimáticas proporcionadas pelo polimorfismo dentre os sistemas analisados, como no caso da GSTP1 e ACP1 podem favorecer ou desfavorecer o indivíduo frente a situações que envolvem pressão seletiva, como doenças infecciosas. O elevado índice de indivíduos infectados por *Plasmodium*, o número de óbitos durante a construção da Estrada de Ferro Madeira Mamoré no início do século XIX, e o intenso uso de drogas antimaláricas alterando o comportamento de diversas enzimas eritrocitárias (Farombi e cols., 2000; Müftüoglu e Özer, 1999), são exemplos de uma forte influência seletiva sobre os trabalhadores que migraram para esta região. Seria exemplo de seleção rápida devido a condições ambientais que levam à permanência ou saída dos indivíduos destas regiões geográficas.

Os dados obtidos podem contribuir como base para análises mais detalhadas e compreensão das relações entre patógenos e hospedeiro humano, levando ao melhoramento de atendimento clínico de indivíduos que apresentam infecção por Plasmódio e à compreensão dos fatores genéticos responsáveis pela estrutura de populações humanas.

RELAÇÕES PATÓGENO-HOSPEDEIRO

A variabilidade genética dos seres vivos é um dos principais determinantes da diversidade de respostas que se observam nas relações patógeno-hospedeiro. Nos seres humanos é responsável pelos diferentes graus de suscetibilidade/resistência a doenças infecciosas, expressas nas manifestações clínicas do hospedeiro à infecção. Malária tem sido intensivamente estudada e já foram identificados locos de resistência à infecção, como o sistema Duffy em relação ao *P. vivax* e de resistência a formas graves da doença, como o loco da Hemoglobina (HBS) em relação ao *P. falciparum*. Indivíduos portadores do vírus HIV-1 podem ser resistentes a AIDS, se a linhagem do vírus apresentar tropismo à mutação $\Delta 32$ do sistema CCR5 (Gilliam e cols., 2010).

No Brasil as regiões endêmicas concentram-se no Norte de tal modo, que 90% dos registros de infecções por malária, cerca de 600 a 800 mil casos anualmente, são registrados nesta região (Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2008). Várias são tentativas em busca de um melhor tratamento, na criação de uma vacina, ou de estudos epidemiológicos mais adequados, devido ao surgimento de casos de resistências à cloroquina (Deharo e cols., 2003; Farombi e cols., 2000), por exemplo.

Até há pouco tempo havia pouca ou nenhuma informação sobre a genética das relações patógeno-hospedeiro envolvendo o metabolismo de drogas anti-maláricas e uma das preocupações atuais é identificarem-se os genes responsáveis pelo metabolismo dos medicamentos empregados no tratamento de doenças, infecciosas ou consequentes de mutações gênicas.

As propriedades farmacocinéticas de alguns antimaláricos foram essenciais para o estabelecimento de rotas metabólicas e de descrição dos polimorfismos envolvidos nestes processos, no hospedeiro humano (Ingelman-Sundberg e Sim, 2010; Janha e cols., 2009; Krishna e White, 1996).

Para se formar uma competência nesta linha de Pesquisa, iniciou-se a descrição da estrutura da população desta região endêmica para malária *vivax* e com incidência considerável de malária falcípara. Determinar a frequência de genes envolvidos em processos de resistência/suscetibilidade é considerado fator essencial para análise da

resposta do hospedeiro humano no tratamento por antimaláricos e outras associações envolvendo doenças emergentes, reemergentes e genéticas (Santos e cols., 2012, submetido; Farias e cols., 2012; Andrade-Casseb e cols., 2008; Heckmann e cols., 2005; Ferreira e cols., 2002; Pereira da Silva e Engracia, 2002).

As análises sobre associação entre os fenótipos clínicos de malária e os genótipos dos hospedeiros foram realizadas apenas nos indivíduos das amostras dos bairros Candelária e Bate-Estaca, segundo a metodologia descrita no item *População e Área de Estudo* do capítulo Material e Métodos, em colaboração com as equipes médicas e paramédicas do CEPEN.

Malária e Marcadores Genéticos

Loco CCR5

O envolvimento de quimionas e seus respectivos receptores em patologias como a malária cerebral tem sido relatado em diversos trabalhos, frequentemente em indivíduos infectados por *P. falciparum*. Segundo Omer e cols. (2003) a produção de citocinas pró-inflamatórias exerce um controle da parasitemia na fase inicial da infecção por *P. yoelli*, sendo a produção excessiva comumente associada à forma grave da doença (Day e cols., 1999), evidenciando que o desenvolvimento de complicações na malária está diretamente relacionado à resposta imune do hospedeiro. Sarfo e cols. (2005) demonstraram alterações marcantes no aumento da expressão de mRNA de moléculas de adesão, citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-4), iNOS e quimiocinas, incluindo RANTES/CCL5 e seus receptores (CCR1, CCR3 e CCR5), durante o pico de parasitemia de camundongos *Swiss* infectados com *P. yoelii* 17XL. Um estudo anterior, realizado em camundongos deficientes do gene CCR5 e infectados com *P. berghei* ANKA mostrou menor suscetibilidade a malária cerebral, quando comparados com animais C57Bl/6 selvagens (Belnoue e cols., 2003), evidenciando uma propriedade de resistência devido ao polimorfismo observado neste loco gênico. Segundo Ubogu e cols. (2006) quimiocinas e seus receptores estão envolvidos na formação de infiltrados

inflamatórios, apresentando assim, um importante papel na manutenção e no prolongamento da resposta inflamatória, e consequentemente, desenvolvimento de patologia cerebral.

O receptor de quimiocinas CCR5 foi incluído em nossas análises de associação com infecção por *Plasmodium* por já terem sido relatados casos de associação com Plasmodio, na literatura. Pelos nossos resultados, não pudemos associar nenhuma resposta biológica dos indivíduos à infecção por *P. vivax* ou *P. falciparum*, em relação a este loco. A tabela 19 resume nossos dados. As frequências mais altas da mutação CCR5 Δ 32 foram observadas na amostra de mães e recém-nascidos (0,031 e 0,035, respectivamente). Não houve acompanhamento longitudinal do CEPEM nesta amostra, e a malária foi relatada pelas mães, no inquérito genético-epidemiológico efetuado pelos geneticistas. Em Candelária e Bate-Estaca a frequência alélica foi igual a 0,018.

Loco CYP2E1

Drogas usadas para tratamento da malária, como o quinino e a cloroquina, sofrem em sua metabolização a ação de enzimas hepáticas que agem na fase I da biotransformação. As rotas metabólicas de drogas antimaláricas têm sido elucidadas e o complexo enzimático CYP vem sendo descrito como fundamental nos processos farmacocinéticos, uma vez que estas enzimas são responsáveis pelo metabolismo de cerca de 80% das drogas antimaláricas (Eichebaum e cols., 2006). As interações medicamentosas destas drogas podem inibir ou induzir a atividade de enzimas do polimorfismo CYP, dentre elas as sintetizadas pelo gene CYP2E1. O benefício terapêutico de pacientes com malária nestes casos somente seria possível com o monitoramento de doses terapêuticas, considerando as diferenças existentes na atividade enzimáticas das isoformas de CYPs, podendo assim influenciar na ação de metabolização do medicamento. Ganesan e cols. (2009) constataram que as múltiplas isoformas de CYP, dentre elas a CYP2E1, contribuem de forma variável para a hemotoxicidade por primaquina. O conhecimento dos polimorfismos destas isoformas presente no indivíduo torna-se útil no controle da toxicidade da primaquina aumentando,

assim, sua utilidade terapêutica. Nesta Tese, que descreve o polimorfismo do gene CYP2E1, sem termos feitos abordagens ou análises mais aprofundadas sobre associações, não foi possível atribuir às frequências observadas nenhum efeito de malária sobre a distribuição observada. Nenhuma associação estatisticamente significativa com fenótipos de malária foi detectada (tabela 20).

Locos GSTP1 e GSTT1

As enzimas GSTs apresentam a propriedade de conjugarem o GSH, o tripeptídeo glutatião, a vários compostos externos ao nosso organismo, de origens ambientais, produzidos por parasitas ou drogas quimioterápicas, ou mesmo raios ultra-violetas, calor, etc.. Sua ação de detoxificação sugere um importante papel na suscetibilidade a várias doenças, sejam ambientais, infecto-contagiosas ou com componente genético considerável (Abbas e cols., 2004; Chen e cols., 2002). Devido a esta capacidade, as famílias gênicas Glutatião S-transferase têm sido alvo de estudo de associação com o desenvolvimento da malária.

Nesta Tese, nenhuma associação entre malária por infecção por *P. falciparum* ou *P. vivax* e os fenótipos de GSTP1 e GSTT1 foi observada (tabelas de 21 e 22). A frequência do alelo nulo, descrito nas famílias GSTs em associação a malária (Kavishe e cols., 2009; Kavishe e cols., 2006) foi encontrado em número elevado no loco GSTT1, nos bairros de Candelária e Bate-Estaca, Pedras Negras e de Pacientes com infecção por *Plasmodium*, indo de 0,58 a 0,72, mas não havendo significância na associação ou heterogeneidade entre as amostras (tabela 06). Nas amostras de Mães e Recém-nascidos as frequências observadas foram 0,42 e 0,49, respectivamente.

Em populações Afro-descendentes, a proporção de GSTT1-nulo pode variar de 19 a 37% (Torres e cols., 2001; Ford e cols., 2000; Arruda e cols., 1998; Masimirembwa e cols., 1998; Mukanganyama e cols., 1997; Chen e cols., 1996), e em populações Euro-descendentes de 12 a 25% (Landi e cols., 2000; Houlston e cols., 1999; entre outros).

Nossa expectativa, ao estudarmos o polimorfismo de GSTT1, adveio de relatos da ação das GSTs, na literatura, e da frequência alta do alelo nulo nesta região, embora anteriormente tenhamos observado uma frequência muito baixa no loco GSTM1, como descrito em trabalhos anteriores (Holanda, 2003; Dissertação de Mestrado). A atividade destas enzimas mantém o equilíbrio de radicais livres nos parasitas, e desta forma, a inibição delas faz com que o parasita morra em consequência do estresse oxidativo (Mahajan, e cols., 2005). Conforme descrito por Mukanganyama e cols. (2002), a família gênica de Glutatio S-Transferase *Pi* (GSTP1) apresenta altos níveis enzimáticos nos eritrócitos. Assim, acredita-se que esta enzima tenha grande relação com o desenvolvimento clínico desta patologia. A GST, como um anti-oxidante, é requerido para o crescimento do parasita, bem como para a manutenção do estado redox da célula hospedeira (Kavishe e cols., 2006).

Vários estudos mostram que a ação de drogas anti-maláricas, principalmente compostos derivados de quinonas, afetam as proteínas de equilíbrio oxidativo nos eritrócitos. A interação entre primaquina e NADPH, e a auto-oxidação da primaquina, resulta na formação de Espécies Reativas do Oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), levando a alterações oxidativas nos eritrócitos (Müftüoglu e Özer, 1999). Também a administração de cloroquina pode levar a alteração na atividade de várias enzimas eritrocitárias, como inibição das enzimas Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD), Catalases (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) e Glutatio S-Transferase (GST). Outras drogas utilizadas no tratamento da malária, como Amodiaquina, Mefloquina e Halofantrina podem gerar padrão de alteração enzimática, interferindo no sistema de metabolismo de drogas, já que alteram o funcionamento das GSTs, além de aumentar a peroxidação lipídica (Farombi e cols., 2000; Müftüoglu e Özer, 1999).

Decidimos estudar este polimorfismo desde que alguns trabalhos da literatura, em relação à malária falcípara, sugerem que ele possa ter um efeito substrato-dependente na atividade enzimática (Sundberg e cols., 1998; Watson e cols., 1998; Hu e cols., 1997). Na infecção por *P. falciparum*, em amostras de indivíduos residentes em Iaundé, capital de Camarões, África Ocidental, este polimorfismo, na manifestação grave e nas complicações menores da doença, não apresentou frequências genotípicas estatisticamente significantes, embora houvesse diferenças entre elas. O polimorfismo

observado no loco GSTP1 não apresentou diferenças na associação com fenótipos clínicos de malária (Kavishe e cols., 2006). Ainda na África, em Mnyuzi na, Tanzânia (África Oriental), Kavishe e cols. (2009) encontraram prevalência significativa de maior número de indivíduos homozigotos GSTP1*B/GSTP1*B no grupo de malária grave (26%) do que no grupo de malária leve (10,3%).

Loco ACP1

As análises sobre o polimorfismo do loco ACP1 foram realizadas apenas nas amostras e Mães e RN do Hospital de Base de Porto Velho, RO. Os dados obtidos no inquérito antropogenético da amostra Mães, referentes a episódios de malária relatada (*vivax*, falcípara e mista) mostraram que não houve diferenças estatisticamente significantes quando foram comparados os fenótipos de malária *vivax* ($p = 0,0099$) e falcípara ($p = 0,0095$). O alelo ACP1*C foi observado nas mães que relataram ter tido malária *vivax*, mista e nas que relataram não ter tido malária, com frequências alélicas respectivas de 0,0213, 0,0312 e 0,0137. No entanto, este alelo não foi observado nas Mães que relataram ter tido malária falcípara. Estudos iniciados por Modiano e cols. (2001) testaram a resistência clínica da HB C à malária falcípara, em amplo estudo realizado em Burkina Faso (África), havendo uma redução alta na parasitemia em indivíduos HB AS e HB AC (Pascal e cols., 2004). Andrade-Casseb e cols. (2008) mostraram a incidência relativamente alta destas variantes polimórficas da Hemoglobina (Andrade-Casseb e cols., 2008) nesta região geográfica, o que poderia explicar os dados obtidos nesta associação da ACP1 com malária falcípara na amostra Mães deste trabalho. Bottini e cols. (2002) discutiram o papel da HBC em malária e sugeriram que em regiões endêmicas para malária falcípara o alelo*C tende a possuir frequências menores do que em outras regiões não endêmicas (Bottini e cols., 2002), o que explicaria os resultados em Candelária e Bate Estaca.

ACP1, ou Proteína Tirosina Fosfatase de baixo peso molecular (LMWTPT), possui um papel fisiológico na desfosforilação da fosfotirosina e da proteína da banda III (Bottini e cols., 2009; Bottini e cols., 2002). Já foi observada correlação negativa dos

níveis de isoformas de ACP1 com resistência à malária falcípara (Bottini e cols., 2002; Palmarino e cols., 1975), o que reforça a conclusão de que a amostra Mães do Hospital de Base apresentou uma associação envolvendo ACP1 e Hemoglobina que, em tese, as protegeu da manifestação de malária falcípara. Estudos realizados em populações da Sardenha, em regiões endêmicas para malária, até ao redor dos anos 30 do século XX, mostram menor concentração da isoforma *s* de ACP1 quando comparada com uma população próxima a ela, nunca endêmica ou mesmo com baixo índice de malária, sugerindo que genótipos com altas concentrações de isoforma *s* podem ter sido submetidos à seleção negativa em um ambiente com malária. Nesta localidade, incluindo a região Mediterrânea, o mecanismo bioquímico pelo qual a ACP1 (LMPTP) modula a expressão clínica da malária pode estar relacionado com aqueles envolvidos na manifestação de favismo (Bottini e cols., 2001; Bottini, 1999).

6. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas a partir dos dados expostos ao longo deste trabalho foram as seguintes:

1. Observando as distribuições gênicas e genotípicas dos locos CCR5, CYP2E1, GSTP1, GSTT1 e ACP1 obtidas neste estudo, verificou-se que a população estudada não difere, em seus padrões de frequência, de outras populações brasileiras.
2. A presença do alelo CCR5 Δ 32 no vilarejo quilombola indica a presença de genes europeus nesta população e este fato pode modular a disseminação do vírus HIV, emergente nesta região.
3. Os valores observados de diferenciação gênica e genotípica na amostra de pacientes com infecção por *Plasmodium* com Mães e Recém-nascidos, podem ser reflexos de padrões migratórios e étnicos que a população apresenta dada a distribuição dos genes observada.
4. A ausência do alelo ACP1*C no grupo de mães no grupo que relatou ter sido infectada e manifestado a malária *falcípara* pode ser um indicativo do efeito protetor, descrito na literatura, que este alelo confere à evolução clínica da malária falcípara.
5. Os resultados obtidos neste estudo podem contribuir para o delineamento de estudos epidemiológicos na população de Rondônia que incluem o controle de doenças como a malária e AIDS.

7. PERSPECTIVAS

Iremos dar prosseguimento às análises da variação genética do hospedeiro nas manifestações clínicas da malária, associando outros sistemas genéticos que têm indicativo de correlação clínica. A questão da modulação da resposta genética à quimioterapia da Malária deverá ser investigada por nós, acrescentando outras linhas de Pesquisa ao Projeto, na determinação do efeito de drogas antimaláricas em indivíduos que apresentam diferentes genótipos resultantes do polimorfismo observado nos genes codificadores de enzimas do Metabolismo de xenobióticos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A; Delvinquière K, Lechevrel M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G, Sichel F. 2004. GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: Different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 10(23):3389-3393.
- Adbel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA e Au WW. 1996. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 107(2):229-33.
- Ahmad R, Srivastava AK. 2006. Effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on hepatic and splenic glutathione-S-transferase(s) in Swiss albino and db/+ mice: efficacy of mefloquine and menadione in antimalarial chemotherapy. *Parasitology* 134:931-938.
- Alam R, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett-Brown MA, Grant JA. 1993. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 150:3442-3448.
- Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao Jia-Xi, Buolamwini J. 1997. Molecular Cloning, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of Full-length cDNAs of Three Human Glutathione S-Transferase *Pi* Gene Variants evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *Journal of biological chemistry* 272(15): 10004-10012.
- Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt H, Pena SDJ, Prado VF. 2000. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 67:444-461.
- Andrade-Casseb A, Krauze A, Lafontaine RM, Tada MS, Silva WA, Simões AL, Engracia V. 2008. Distribution of hemoglobin phenotypes in four different districts of Porto Velho, Rondonia, Brazil. *Hum Biol* 80:573-579.
- Armstrong RN. 2000. Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. *Biochemistry* 39:13625-13632.

- Arruda VR, Grignolli CE, Gonçalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad STO, Costa FF. 1998. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase *mu* (GSTM1) and *theta* (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to enviromental carcinogenesis? *Clin. Genet.* 54:210-214.
- Autrup H. 2000. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as suscetibility factors in toxic response. *Mut. Res.* 464:65-76.
- Belnoue E, Kayibanda M, Deschemin J-C, Viguier M, Marck M, Kuziel WA, e Rénia L. 2003. CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood* 101:453-4259.
- Beutler E, Dunning D, Dabe IB, Forman L. 1988. Erythrocyte glutathione S-transferase deficiency and hemolytic anemia. *Blood* 72:73-77.
- Board P, Harries M, Flanagan J, Langton L, Coogan M. 1998. Genetic heterogeneity of the structure and function of GSTT2 and GSTP1. *Chemico-Biological Interactions* 111-112:83-89.
- Board PG, Coggan M, Johnston P, Ross V, Suzuki T, Webb CG. 1990. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmacol Ther.* 48:357-369.
- Boldt ABW, Culp L, Tsuneto LT, Souza IR, Kun JFJ e Petzl-Erler ML. 2009. Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindian and high CCR5 Δ 32 frequency in Euro-Brazilians. *Genet Mol Biol* 32:12-14.
- Bortolini MC, Weimer TA, Salzano FM, Moura LB e Silva MCB. 1995. Genetic structure of two urban Afro-Brazilian populations. *Int. J. Anthropol.* 12:5-16.
- Bottini E, Gloria-Bottini F. 2009 Genetic polymorphism of adenosine deaminase and early neonatal events: is there an association with susceptibility to coronary artery disease in adult life? *Cardiology* 114:100-101; author reply 102.
- Bottini E, Palmarino R, Lucarelli P, Lista R e Bottini N. 2001. ACP1 and human adaptability: association with past malarial morbidity in the Sardinian population. *Am J. Hum. Biol.* 13:753-760.

- Bottini E. 1999. Association between cytosolic low molecular weight phosphotyrosine-phosphatase and malaria--a possible mechanism. *Am J Phys Anthropol* 108:241-244.
- Bottini M e Bottini GF. 2004. Seasonal variation of Genotype – Specific Fertility and Adaptation to Endemic Diseases: A Study in Past Malarial Areas of Italy. *Human Biology* 76(6):837-848.
- Bottini N, Bottini E, Gloria-Bottini F, Mustelin T. 2002. Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human diseases: search of biochemical mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp* 50(2):95-104.
- Bottini N, Gloria-Bottini F, Amante A, Saccucci P, Bottini E. 2005. Genetic polymorphism and TH1/TH2 orientation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 138:328-333.
- Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. 1996. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 56:3915-3925.
- Bryson GLM, Massa H, Trask BJ, Van Etten RL. 1995. Gene structure, sequence, and chromosomal localization of the human red cell-type low molecular weight acid phosphotyrosyl phosphatase gene, ACP1. *Genomics* 30:133-140.
- Budowle B, Sundaram S, Wenk RE. 1985. Population data on the forensic genetic markers: phosphoglucomutase-1, esterase D, erythrocyte acid phosphatase and glyoxylase I. *Forensic Sci Int* 28:77-81.
- Cantanhêde LM. 2010. Determinação dos Haplogrupos A, B, C e D de DNA mitocondrial, na Busca da Ancestralidade Genética da População Urbana de Porto Velho Estado de Rondônia. Monografia. Faculdades Integradas Aparício Carvalho.
- Carvalhaes FAPL, Cardoso GL, Hamoy IG e Guerreiro JF. 2004. Distribution of CCR5- Δ 32, CCR2-64I, SDF1-3'A Mutations in Populations from the Brazilian Amazon Region. *Human Biology* 76(4):643-646.

- Carvalho MWP, Lebouté APM, Oliveira SF, Sousa SMB, Klautau-Guimarães, Simões AL. 2004. CCR5D32 mutation in three Brazilian populations of predominantly Sub-Saharan African ancestry. *Genetics and Molecular Biology* 27(3): 231-325.
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. 2001. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am. J. Genet.* 68:281-286.
- Chen C, Liu Q, Relling MV. 1996. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American Whites and Blacks. *Pharmacogenetics* 6:187-191.
- Chen SS, Chang LS, Chen HW, Wei YH. 2002. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum Reprod* 17:718-725.
- Chies JA, Hutz MH. 2003. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 36:71-75.
- Coggan M, Whitbread L, Whittington A e Board. 1998. Structure and organization of the human theta class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochemical Journal* 334:617-623.
- Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. 2009. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1:252-258.
- Daly AK. 1995. Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J Mol Med* 73:539-553.
- Day NP, Hien TT, Schollaardt T, Loc PP, Chuong LV, Chau TT, Mai NT, Phu NH, Sinh DX, White NJ, Ho M. 1999. The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis.* 180(4):1288-1297.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, et al. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* 273:1856-1862.

- Deharo E, Barkan D, Krugliak M, Golenser J, Ginsburg H. 2003. Potentiation of the antimalarial action of chloroquine in rodent malaria y drugs known to reduce cellular glutathione levels. *Biochemical Pharmacology* 66:809-817.
- Dissing J. 1987. Immunocheical characterization of human red cell acid phosphatase isozymes. *Biochem Genet* 25:901-17.
- Dissing J. 1993. Human, “red cell” acid phosphatase (ACP) genetic, catalytic and molecular properties. PhD thesis. Kobenhavn, Denmark: kobernhavn Universitat.
- Driss A, Hibbert JM, Wilson NO, Iqbal SA, Adamkiewicz TV, Stiles JK. 2011. Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria. *Malar J* 10:271.
- Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M e Evans WE. 2006. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 57:119-137.
- Engracia V, Mestriner MA, Cabello PH, Krieger H. 1991. Association between the acid phosphatase 1 and adenosine deaminase systems in a Brazilian sample. *Hum Hered* 41:147-150.
- Engracia V, Mestriner, MA e Krieger H. 1990. Genetics systems and biological traits in normal and chagasic individuals from a Brazilian sample. *Rev. Brasil. Genet.* 13, 4, 835-839
- Engracia V. 1972. Mistura racial em uma população rural brasileira (Racial mixture in a rural Brazilian population) (Portuguese) MD Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, 123 pp.
- Evans WE e Relling MV. 1999. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* (Wash DC) 286:487-491.
- Farabegoli A, Barbuji G. 1990. Diversity of some gene frequencies in European and Asian populations. VI. Geographic patterns of PGM and ACP. *Hum Hered* 40:313-321.
- Farias JD, Santos MG, Krauze A, Delani D, Tada MS, Andrade-Casseb A, Simões AL e Engracia V. 2012. Distribution of the CCR5delta32 allele (gene variant CCR5) in Rondônia, Western Amazonian Region, Brazil. *Genetics Molecular Biology*, 35(1):27-31.

- Farombi E O, Olowu B I, Emerole GO. 2000. Effect of tree structurally related antimalarial drugs on liver microsomal components and lipid peroxidation in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 126, 217-24.
- Ferreira MR. 1987. A Ferrovia do Diabo. Editora Melhoramentos.
- Ferreira RGM, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Alves FP, Camargo LMA, Pereira da Silva LH, Camargo EP, Beiguelman B and Krieger H. 2002. Ethnic Admixture Composition of Two Western Amazonian Populations. *Human Biology* 74(4):607-613.
- Ford JG, Li Y, O'Sullivan MM, Demopoulos R, Garte S, Taioli E, Brandt-Rauf PW. 2000. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung câncer risk in African-Americans. *Carcinogenesis* 21:1971-1975.
- Franco MHL. 1980. Dinâmica gênica e mistura racial em cinco populações brasileiras. Dr. Sc. thesis, Curso de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 178 pp.
- Ganesan S, Tekwani BL, Sahu R, Tripathi LM, Walker LA. 2009. Cytochrome P(450)-dependent toxic effects of primaquine on human erythrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 241:14-22.
- Gao C, Takezaki T, Wu J, Li Z, Wang L, Ding I, Liu Y, Hu X, Xu T, Tajima K e Sugimura H. 2002. Interaction between cytochrome p-450 2e1 polymorphisms and environmental factors with risk of esophageal and stomach cancers in Chinese. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 11:29-34.
- Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, Van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. 2001. Metabolic gene polymorphisms frequencies in control populations. *Can. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 10:1239-1248.

- Garte S. 1998. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis* 19:1329-1332.
- Garte SJ, Trachman J, Crofts F, Toniolo P, Buxbaum J, Bayo S, Taioli E. 1996. Distribution of composite CYP1A1 genotypes in Africans, African-Americans and Caucasians. *Hum Hered* 46:121-127.
- Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A e Weimer T. 2004. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genet. Mol. Biol.* 27(2):133-138.
- Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MAV e Bydlowski SP. 2004. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37:451-458.
- Giblett ER. 1969. Genetic Markers in Human Blood. Blackwell: Oxford, UK.
- Gilliam B, Riedel DJ, Redfield RR. 2010. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. *Journal of Translational Medicine* 9(Suppl 1):S9, Open Access.
- Goedde HW, Hirth L, Benkmann HG, Pellicer A, Pellicer T, Stahn M, Singh S. 1972. Population genetic studies of red cell enzyme polymorphisms in four Spanish populations. *Hum Hered* 22:552-560.
- Gonzalez FJ e Nebert DW. 1990. Evolution of the P450 gene superfamily: nimalplant “warfare”, molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 6:182-186.
- Goudet J, Raymond M, De Meeüs T and Rousset F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144:1933-1940.
- Grimaldi R, Shindo N, Acosta AX, Dourado I, Brites C, de Melo Carvalho O, Brito I, Bou-Habib DC and Galvao-Castro B. 2002. Prevalence of the CCR5Δ32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. *Hum Genet.* 111:102-4.

- Guerra A, Rego C, Silva AP, Castro EMB, Nobrega C, Aguiar A, Bicho MP. 2008. Estudo prospective do estado de nutrição e do perfil lipídico tendo em conta o polimorfismo genético da fosfatase ácida de baixo peso molecular (LMW-PTP) em crianças saudáveis. *Endocrinologia, Diabetes & Obesidade* 2(3):68-72.
- Guo SW e Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
- Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. 1997. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S- transferase *Pi* locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 18:641-644.
- Hartl D. 2000. A primer of population genetics. 3 ed. Sinauer Assoc. Publisher, Sunderland MA, EUA.
- Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. 1991. Genetic polymorphisms in the 5-prime-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J. Biochem.* 110:559-565.
- Heckmann MI, Mendes-Junior CT, Tada MS, Santos MG, Cabello GM, Salzano FM, Simões AL e Engracia V. 2005. CFTR haplotype distribution in the Brazilian Western Amazonian region. *Human Biology* 77: 499-508.
- Hellier S, Frodsham AJ, Hennig BJ, Klennerman P, Knapp S, Ramaley P, Satsangi J, Wright M, Zhang L, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. 2003. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 38:1468-1476.
- Higuchi R. 1989. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich, H.A., (Ed.) PCR technology – principles and applications for DNA amplification, pp 36 New York: Stockton, Press.
- Holanda FJ. 2003. Caracterização Genotípica e Alélica Do Glutathione S-transferase classe μ , Enzima do Metabolismo de Xenobióticos. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal de Rondônia. 79pp.
- Hopkinson DA, Spencer N, Harris H. 1963. Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism. *Nature* 199:969-971.

- Houlston RS. 1999. Glutathione S-transferase M1 Status and Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:675-682.
- Howard OM, Shirakawa AK, Turpin JA, Maynard A, Tobin GJ, Carrington M, Oppenheim JJ, Dean M. 1999. Naturally occurring CCR5 extracellular and transmembrane domain variants affect HIV-1 Co-receptor and ligand binding function. *J Biol Chem* 274:16228-16234.
- Hu X, Xia H, Srivastava SK, Herzog C, Awasthi YC, Ji XH, Zimniak P, Singh SV. 1997. Activity of four allelic forms of glutathione S-transferase hGSTP1-1 for diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun* 238:397-402.
- Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Zhanqun J, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. 1996. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med.* 2:1240-1243.
- Huber PC e Almeida WP. 2008. Glutathione e Enzimas Relacionadas: Papel Biológico e Importância em Processos Patológicos. *Quim. Nova* 31(5):1170-1179.
- Hünemeier T, Neves AG, Nornberg I, Hill K, Hurtado AM, Carnese FR, Goicoechea AS, Hutz MH, Salzano FM e Chies JA. 2005. T-cell and chemokine receptor variation in south Amerindian populations. *Am J Hum Biol* 17:515-518.
- Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, Medana IM, Miu J, Ball HJ. 2006. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol* 36:569-582.
- Hütter G e Ganepola S. 2011. The CCR5-delta32 polymorphism as a model to study host adaptation against infectious diseases and to develop new treatment strategies. *Exp Biol Med* 236:938-943.
- Ingelman-Sundberg M e Sim SC. 2010. Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochem Biophys Res Commun* 396:90-94.
- Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW, Sim SC. 2006. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Disponível em: <<http://www.cypalleles.ki.se>>.

- Ingelman-Sundberg M. 2005. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 5:6-13.
- Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, Takahashi H, Fukuchi Y, Ouchi Y. 1999. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 54:693-696.
- Janha RE, Sisay-Joof F, Hamid-Adiamoh M, Worwui A, Chapman HL, Opara H, Dunyo S, Milligan P, Rockett K, Winstanley P, Pirmohamed M, Miller AK, Conway DJ, Walton RT. 2009. Effects of genetic variation at the CYP2C19/CYP2C9 locus on pharmacokinetics of chlorcycloguanil in adult Gambians. *Pharmacogenomics* 10:1423-1431.
- Jano M, Heckmann MIO, Farias JD, Simões AL e Engracia V. 2005. Distribuição de Dois Haplótipos do mtDNA em Amostras de Porto Velho – RO. 51°. Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.
- Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Mannervik B. 1998. Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J. Mol. Biol.* 278:687-698.
- Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A, Harris CC. 1992. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.* 52:6712-6715.
- Kavishe RA, Bousema T, Shekalaghe SA, Sauerwein RW, Mosha FW, van der Ven AJ, Russel FG, Koenderink J. 2009. Common genotypic polymorphisms in glutathione S-transferases in mild and severe falciparum malaria in Tanzanian children. *Am J Trop Med Hyg* 81:363-365.
- Kavishe RA, Koenderink JB, McCall MB, Peters WH, Mulder B, Hermesen CC, Sauerwein RW, Russel FG, Van Der Ven AJ. 2006. Severe *Plasmodium falciparum* malaria in cameroon: associated with the glutathione s-transferase m1 null genotype. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(5):827-829.
- Kleyn PW e Vesell ES. 1998. Genetic variation as a guide to drug development. *Science* (Wash DC) 281:1820-1821.

- Kolble K. 1993. Regional mapping of short tandem repeats on human chromosome 10: cytochrome P450 gene CYP2E, D10S196, D10S220, and D10S225. *Genomics* 18:702-704.
- Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevedo E, Freire-Maia A, Yasuda N. 1965. Racial admixture in north-eastern Brazil. *Ann Hum Genet* 29:113-125.
- Krieger H. 1966. Inbreeding effects in north-eastern Brazil. Ph.D. Thesis, U. Hawaii.
- Krishna S e White NJ. 1996. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. Clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 30:263-299.
- Kwiatkowski D. 2000. Genetic susceptibility to malaria getting complex. *Curr Opin Genet Dev.* 10(3):320-4.
- Ladero JM, Martínez C, Gacía-Martín E, Ropero P, Briceño O, Villegas A, Díaz-Rubio M, Agúndez JAG. 2006. Glutathione S-Transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are not related to the risk of hepatocellular carcinoma: A study in the Spanish population. *Euro Jour Cancer* 42:73-77.
- Landi S. 2000. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens, a review. *Mutation Research*, 463:247-283.
- Lazaruk KDA. 1995. Molecular genetics of human red cell acid phosphatase. PhD dissertation, University of California, Berkeley, Professor Sensabaugh GF, Chair.
- Leichsenring A, Losi-Guembarovski R, Maciel ME, Losi-Guembarovski A, Oliveira BW, Ramos G, Cavalcanti TCS, Bicalho MG, Cavalli IJ, Cólus IMS, Ribeiro EMSF. 2006. CYP1A1 and GSTP1 polymorphisms in an oral cancer case-control study. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39(12):1569-1574.
- Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Gustafsson LL, Masimirembwa CM. 2003. Identification of human cytochrome P(450)s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data. *Eur J Clin Pharmacol* 59:429-442.
- Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, de la Rúa C, Ferrari C, Ferrec C, Glover G, Grinde B, Güran S, Kucinskas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G. 1998. The Δ CCR5 mutation

conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet* 7(3): 399-406.

Lidén K, Linderholm A e Götherström A. 2006. Pushing it back. Dating the CCR5-D32 bp deletion to the Mesolithic in Sweden and its implications for the Meso/Neo transition. *Doc Praehist* 33:29-37.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA e Landau NR. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 86:367-77.

Liu S, Park JY, Schantz SP, Sten JC e Lazarus P. 2001. Elucidation of CYP2E1 5' regulatory RsaI/PstI allelic variants and their role in risk for oral cancer. *Oral Oncology* 37:437-445.

London SJ, Yuan JM, Chung FL, Gao YT, Coetzee GA, Ross RK. 2000. Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung- cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 356:724-9.

Mahajan S, Atkins WM. 2005. The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cell Mol Life Sci* 62:1221-1233.

Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgensten R, Muramatsu M, Pearson WR, *et al.* 1992. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J* 282 (Pt 1):305-306.

Marchini J, Cardon LR, Phillips MS, Donnelly P. 2004. The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nat Genet* 36:512-517.

Marmor M, Sheppard HW, Donnell D, Bozeman S, Celum C, Buchbinder S, Koblin B, Seage GR 3rd. 2001. Homozygous and heterozygous CCR5-Delta32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27:472-481.

Martins MFAE, Carvalho R, Alves M, Ferreira SMAC, Bicho PDM. 2008. Polimorfismos Genéticos da Proteína Tirosina Fosfatase de Baixo Peso Molecular (LMW-PTP): Sua relação com o Fenótipo Enzimático Eritrocitário em doentes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Reumatologia – *Acta Reumatol. Port.* 33:177-187.

- Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT e Clegg JD. 1997. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Natur Genet.* 16:100-103.
- Masimirembwa CM, Dandara C, Sommers DK, Snyman JR e Hasler JA. 1998. Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1, microsomal epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase M1 and T1 in Zimbabweans and Venda of Southern Africa. *Pharmacogenetics* 8:83-85.
- Mitrunen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, Vainio H, Uusitupa M, Hirvonen A. 2001. Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:229-236.
- Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpoire J, Verra F, Konate A, Rastrelli E, Olivieri A, Calissano C, Paganotti GM, D'Urbano L, Sanou I, Sawadogo A, Modiano G, Coluzzi M. 2001. Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 414:305-308.
- Mourant AE, Godber MJ, Kopec AC, Tills D, Woodhead BG. 1976. Genetical studies at high and low altitudes in Ethiopia. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 194:17-22.
- Müftüoğlu M e Özer N. 1999. The in vitro effects of the antimalarial drug primaquine, on the activities of some enzymes in human erythrocyte lysates. *Tropical Journal Of Mededical Sciences* 29:409-12.
- Mukanganyama S, Widersten M, Naik YS, Mannervik B, Hasler JA. 2002. Inhibition of Glutathione S-Transferases by Antimalarial Drugs Possible Implications for Circumventing Anticancer Drug Resistance. *Int. J. Cancer* 97:700-705.
- Mukanganyama S, Masimirembawa CM, Naik YS, Hasler JA. 1997. Phenotyping of the glutathione S-transferase M1 polymorphism in Zimbabweans and the effects of chloroquine on blood glutathione S-transferases M1 and A. *Clin Chim Acta* 265:145-155.
- Murphy SC e Breman JG. 2001. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 64:57-67.

- Muxel SM, Borelli SD, Amarante MK, Voltarelli JC, Aoki MN, Oliveira CEC, Watanabe MAE. 2008. Association Study of CCR5 Delta 32 Polymorphism among the HLA-DRB1 Caucasian Population in Northern Paraná, Brazil. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 22: 229-233.
- Nebert DW. 1997. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist. *Am J Hum Genet* 60:265-271.
- Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X e cols. 1995. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase *Theta*. *Carcinogenesis* 16:1243-1245.
- O'Brien SJ e Dean M. 1997. Genes que oponen resistencia al sida. *Investigación y ciencia* 6-14.
- Oh SS, Chishti AH, Palek J, Liu SC. 1997. Erythrocyte membrane alterations in *Plasmodium falciparum* malaria sequestration. *Curr Opin Hematol* 4:148-154.
- Okino ST, Quattrochi LC, Pendurthi UR, McBride OW & Tukey RH. 1987. Characterization of multiple human cytochrome P-450 1 cDNAs: The chromosomal localization of the gene and evidence for alternate RNA splicing. *Journal of Biological Chemistry* 262:16072-16079.
- Omer FM, de Souza J, Riley EM. 2003. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol.* 15;171(10):5430-5436.
- Omura T. 1999. Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun* 266:690-698.
- Oppermann M. 2004. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal* 16:1201-1210.
- Palmarino R, Agostino R, Gloria F, Lucarelli P, Businco L, Antognoni G, Maggioni G Workman PL e Bottini E. 1975. Red cell acid phosphatase: another polymorphism correlated with Malaria? *Am J Phys Anthropol* 43:177-186.

- Pandya U, Srivastava SK, Singhal SS, Pal A, Awasthi S, Zimniak P, Awasthi YC, Singh SV. 2000. Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278:258-262.
- Parl FF. 2005. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett.* 221:123-129.
- Parra EJ, Teixeira-Ribeiro JC, Caeiro JLB e Riveiro A. 1995. Genetic structure of the population of Cabo Verde (West Africa): Evidence of substantial European admixture. *Am. J. Phys. Anthropol.* 97:381-389.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. 2002. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Genetics*, 100(1):177-182.
- Pascal R, Flori L, Tall F, Traoré AS, Fumoux F. 2004. Hemoglobin C is associated with reduce *Plasmodium falciparum* parasitemia and low risk of mild malaria attack. *Human Molecular Genetics* 13(1):1-6.
- Passos GAS e Picanço VP. 1998. Frequency of the Δ CCR5 deletion allele in the urban Brazilian population. *Immun Letters* 61:205-7.
- Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA. 1996. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med* 2:412-417.
- Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B e Taylor JB. 1994. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300:271-276.
- Pereira RW, Pires ER, Duarte APM, de Moura RP, Monteiro E, Torloni H, Proietti AB, Simpson AJG e Pena SDJ. 2000. Frequency of the CCR Δ 32 allele in Brazilians: a study in colorectal cancer and in HTLV-I infection. *Genet Mol Biol* 23(3):523-526.
- Pereira-da-Silva LH e Engracia V. 2002. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. *Ciência & Saúde Coletiva* 7(1):49-63.

- Persson I, Johansson I, Bergling H, Dahl ML, Seidegard J, Rylander R, Rannug A, Hogberg J, Ingelman-Sundberg M. 1993. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett.* 319(3):207-211.
- Pinto EP. 1993. Rondônia, evolução histórica: criação do Território Federal de Guaporé, fator de integração nacional. Ed. Expressão e Cultura. Rio de Janeiro, 216 pp.
- Raymond M e Rousset F. 1995. GENEPOP (version 3.4): population genetics software for exact tests and ecumenism. *J Hered* 86:248-249.
- Rossini A, Rapozo DC, Soares Lima SC, Guimaraes DP, Ferreira MA, Teixeira R, Kruel CD, Barros SG, Andreollo NA, Acatauassu R, Matos HJ, Albano RM, Pinto LF. 2007. Polymorphisms of GSTP1 and GSTT1, but not of CYP2A6, CYP2E1 or GSTM1, modify the risk for esophageal cancer in a western population. *Carcinogenesis* 28:2537-2542.
- Rossini A, Rapozo DCM, Amorim LMF, Macedo JMB, Medina R, Neto JFN, Gallo CVM, Pinto LFR. 2002. Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. Mol. Res.* 1(3):233-240.
- Rossini A, Soares Lima S, Rapozo DCM, Faria M, Albano RM, Ribeiro Pinto LF. 2006. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz. Journal of Med. and Bio. Res.* 39:195-201.
- Roychoudhury AK e Nei M. 1988. Human Polymorphic Genes: World Distribution. New York, NY: *Oxford University Press*.
- Salzano FM e Freire-Maia N. 1967. Populações Brasileiras, aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- Salzano FM, Mirandola R, Remonatto G, Castro de Guerra D, Silva JR WA, Bortolini MC, Weimer TA, Hutz MH, Zago MA e Silva MCBO. 1999. African-derived South American populations: a history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. *American Journal of Human Biology* 11:551-563.
- Sampaio MIC. 1984. Polimorfismos Enzimáticos Eritrocitários emu ma População de Mães e Recém-nascidos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – São Paulo.

Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto/SP.

- Samson M, Libert F, Doranz Bj, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G e Parmentier M. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-5.
- Santachiara-Benerecetti AS, Beretta M, Negri M, Ranzani G, Antonini G, Barberio C, Modiano G e Cavalli-Sforza LL. 1980. Population genetics of red cell enzymes in Pygmies: a conclusive account. *Am J Hum Genet* 1980,32:934-954.
- Santachiara-Benerecetti AS, Ranzani GN, Antonini G. 1977. Studies on African pygmies. V. Red cell acid phosphatase polymorphism in Babinga pygmies: high frequency of ACPR allele. *Am J Hum Genet* 29:635-638.
- Santos MG, Farias JD, Heckmann MIO, Tada MS, Simões AL e Engracia V. 2012. Distribution of the $\Delta F508$ allele of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator gene in samples of the mixed population of Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Acta Amazônica* (Submitted).
- Santovito A, Burgarello C, Cervella P, Delpero M. 2010. Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, glutathione s-transferases M1 and T1 genes in Ouangolodougou (Northern Ivory Coast). *Genet Mol Biol* 33:434-437.
- Sarfo BY, Armah HB, Irune I, Adjei AA, Olver CS, Shingh S, Lillard Jr JW and Stiles JK. 2005. *Plasmodium yoelli* 17XL infection up-regulates RANTES, CCR1, CCR3 and CCR5 expression, and induces ultrastructural changes in the cerebellum. *Malaria Journal* 16(4):63.
- Sarin K, Kumar A, Prakash A, Sharma A. 1993. Oxidative stress and antioxidant defence mechanism in *Plasmodium vivax* malaria before and after chloroquine treatment. *Indian J Malariol* 30:127-133.
- Schwarcz LM. 1998. História da Vida Privada no Brasil - Contrastes da intimidade contemporânea. *Companhia das Letras*.

- Sidoti A, D'Angelo R, Rinaldi C, De Luca G, Pino F, Salpietro C, Giunta DE, Saltalamacchia F, Amato A. 2005. Distribution of the mutated delta 32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population. *Int J Immunogenet* 32:193-198.
- Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, Mohanty S, Pati SS, Ramteke BK, Bhatt R, Joshi H, Dash AP, Ahuja RC, Awasthi S, Venkatesh V, Habib S. 2008. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcgammaRIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malar J* 7:13.
- Sohail M, Kumar R, Kaul A, Arif E, Kumar S, Adak T. 2010. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria compared to P. falciparum and upregulates the GST level during malarial infection. *Free Radic Biol Med* 49:1746-1754.
- Souza IR, Muniz YC, Saldanha GM, Alves Junior L, da Rosa FC, Maegawa FA, Susin MF, Lipinski MS e Pewll-Erler. 2003. Demographic and genetic structures of two partially isolated communities of Santa Catarina Island, southern Brazil. *Hum Biol* 75:241-253.
- Stefani M, Dolfi F, Camici G, Manao G, Ramponi G. 1993. Dephosphorylation of tyrosine phosphorylated synthetic peptides by rat liver phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes. *FEBS Lett* 326:131-4.
- Stephens EA, Taylor JA, Kaplan N, Yang CH, Hsieh LL, Lucier GW, Bell DA. 1994. Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 4:185-192.
- Sullivan AD, Wigginton J, Kirschner D. 2001. The coreceptor mutation CCR5Delta32 influences the dynamics of HIV epidemics and is selected for by HIV. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10214-10219.
- Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Seidel A, Mannervik B, Jernström B. 1998. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 19: 433-436.
- Tan W, Song N, Wang G, Liu Q, Tang H, Kadlubar FF, Lin D. 2000. Impacto of genetic polymorphisms in cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1, T1 and

- P1 on susceptibility to esophageal cancer among high-risk individuals in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:551-556.
- Teixeira MAD e Fonseca DR. 1998. História Regional (Rondônia), Porto Velho Rondoniana.
- Teixeira MAD. 2004. Campesinato Negro de Santo Antônio do Guaporé. Identidade e Sustentabilidade. Tese de doutorado. Universidade Federal do Pará.
- Teixeira SL, Bastos FI, Hacker MA, Morgado MG. 2009. Distribution of CCR5 genotypes and HLA Class I B alleles in HIV-1 infected and uninfected injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 9:638-642.]
- Torres MR, Dellazzeri L, Gaspar PA, Kvitko K. 2001. Análise do polimorfismo do gene GSTP1, GSTM1 e GSTT1 em caucasoides, negroides e pacientes que desenvolveram câncer de mama. Anais: V Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, Gramado. p:85.
- Ubogu EE, Callahan MK, Tucky BH, Ransohoff RM. 2006. CCR5 expression on monocytes and T cells: modulation by transmigration across the blood-brain barrier in vitro. *Cell Immunol.* 243(1):19-29.
- Vargas AE, Marreno AR, Salzano FM, Bortolini MC e Chies JAB. 2006. Frequency of CCR5 Δ 32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 39:321-325.
- Vergnes H, Constans J, Quilici JC, Lefevre-Witier P, Sevin J, Stevens M. 1980. Study of red blood cell and serum enzymes in five Pyrenean communities and in a Basque population sample. *Hum Hered* 30:171-180.
- Vergnes H, Quilici JC, Gherardi M, Bejarano G. 1976. Serum and red cell enzyme variants in an Amerindian tribe: the Sirionos (Eastern Bolivia). *Hum Hered* 26:252-262.
- Wang S, Lee H, Chen K, Tsai K, Chen CY, Lin P. 1999. Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer* 26:27-34.
- Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. 1998. Human Glutathione S-Transferase P1 polymorphisms: Relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* (Lond.), 19:175-180.

- Weber WW. 1999. Population and genetic polymorphisms. *Molec. Diagnosis* 4:299-307.
- Wilder JA e Hammer MF. 2004. European ACP*1 Allele Has Recessive Deleterious Effects on Early Life Viability. *Hum Biol.* 76(6):817-835.
- Wilkinson DA, Operskalski EA, Busch MP, Mosley JW, Koup RA. 1998. A 32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness. *J Infect. Dis.* 178:1163-1166.
- Zagury JF, Sill A, Blattner W, Lachgar A, Le Buanec H, Richardson M, Rappaport J, Hendel H, Bizzini B, Gringeri A, Carcagno M, Criscuolo M, Burny A, Gallo RC, Zagury D. 1998. Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine. *J Hum. Virol.* 1:282-292.
- Zembrzusi VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. 2006. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann. Hum. Genet.* 70:822-828.

Anexo I – Questionário Antropogenético



**Unidade Laboratorial de
Genética Molecular Humana**
CEP – 78-900-970 CAIXA POSTAL 87
BR 364/KM 3.5
Porto Velho - RO

QUESTIONÁRIO ANTROPOGENÉTICO

Registro	Data da coleta	Entrevistador	Data da Entrevista
Nome da mãe			
Endereço			Telefone
Data de Nascimento	Local de Nascimento	Tempo de Chegada RO	Tempo de Bairro
Estado Civil	Idade	Estatura	Etnia
Tabagismo	Álcool	Outros filho	Quantos filhos
<input type="checkbox"/> Pouco <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> > 5/dia	<input type="checkbox"/> Social <input type="checkbox"/> Pesado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aborto	Endocruzamento		
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Renda familiar	Sistema ABO e Rh	Malária	Tipo de malária
Observações			
Histórico de Doenças			
Registro do RN	Data da Coleta		
Nome do RN			
Data de Nascimento RN	Sexo	Etnia	Peso ao nascer
Estatura	HIV	Sistemas ABO e Rh	Posição na família
Observação do Pediatra			

Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ morador da localidade _____ declaro ter sido plenamente esclarecido sobre o conteúdo do presente termo e que:

- a) Concordo em participar da pesquisa “POLIMORFISMOS DE DNA EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS – DISTRIBUIÇÃO ÉTNICA E ASSOCIAÇÃO A BAIXO PESO AO NASCER” executada por pesquisadores do Instituto de Pesquisa em Medicina Tropical – IPEPATRO e do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP-USP.
- b) O objetivo deste trabalho é o de verificar diferenças nos genes dos sistemas GSTM1 e GSTT1, ver se existem associações com baixo peso do bebê ao nascer, além de criar um banco de DNA para análise de outros polimorfismos de DNA, a serem determinados, e que complementarão o conhecimento sobre problemas de saúde humana..
- c) Minha participação se resume em autorizar o uso de amostras coletadas sob responsabilidade da Dra. Vera Engracia Gama de Oliveira. Não terei que realizar nenhum outro exame além da coleta desta autorização, não terei qualquer tipo de gasto ou ganho e poderei me retirar a qualquer momento desta pesquisa, sem que isto me cause qualquer prejuízo, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores abaixo citados.
- d) Foi informado para mim que as amostras de sangue foram identificadas com um número e não com meu nome. Somente os pesquisadores saberão a quem corresponde cada número. O sangue ficará guardado no laboratório de Genética do Instituto de Pesquisa em Medicina Tropical – IPEPATRO e, quando necessário, para comprovação, no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP-USP.
- e) O trabalho mostrará apenas os resultados e nunca meu nome ou outra informação que me identifique. Todas as informações sobre este estudo estarão sempre à minha disposição.

_____, _____ de _____ de _____

Assinatura: _____

Responsável pela pesquisa: _____

Pesquisadores Responsáveis:

Dr. Aguinaldo Luiz de Simões
Laboratório de Genética e Bioquímica, Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto – USP
Av. Bandeirantes, 3.900, Ribeirão Preto – SP CEP:
14049-900 Telefone: (16) 602 3050

Dra. Vera Engracia Gama de Oliveira
Laboratório de Genética Humana, Instituto de
Pesquisa em Patologia Tropical -IPEPATRO
BR. 364, Km 3,5 –Porto Velho,RO
CEP: 78900-000 , Telefone: (69) 225 9345

Anexo III – Protocolo de Extração de DNA – Método Proteinase K

I - Material e Equipamentos

- Microcentrífuga
- Micropipeta (c/ 1 ponteira/amostra)
- Microtubos de polipropileno tipo "Eppendorf" de 1,5 ml

II - Reagentes e Soluções

- TAMPÃO PARA LISE DE ERITRÓCITOS

Tris/HCl 0,5 M pH 7,6

Sacarose 0,32 M

MgCl₂ 1M

Triton X-100 1%

- TAMPÃO PARA LISE DE LEUCÓCITOS

Tris/HCl 0,5 M pH 8,5

KCl 2M

MgCl₂ 0,5 mM

NP-40 0,45%

Tween 20 (ou 80) 0,45%

- PROTEINASE K: 10 mg/ml

III – Procedimentos

1. As amostras de sangue devem ser colhidas em tubos Vacutainer com EDTA
Volume de 3 a 5 ml (nunca menos do que 2 ml).
2. Proceder alternativamente de acordo com o tipo de amostra:
 - a) sangue total: colocar 500 µl de sangue total em microtubo;
 - b) sangue total glicerolizado: transferir 50 µl de hemácias p/ um microtubo de 1,5 ml;
 - c) *Buffy Coat* (BC): transferir 50µl de *buffy coat* para um microtubo de 1,5 ml;
 - d) Sangue total hemolisado: transferir 300 µl para microtubo e centrifugar. Separar o sobrenadante, se sobrar sedimento, proceder com ele a partir do item 3; caso contrário, usar o sobrenadante a partir do item 7.

3. Acrescentar 1 ml do tampão de lise de eritrócitos (lise 1).
4. Centrifugar a 6000G por 1 minuto e descartar o sobrenadante.
5. Os procedimentos 3 e 4 devem ser repetidos até que o precipitado fique límpido, indicando ausência de contaminação com a hemoglobina. Normalmente 3 vezes são suficientes.
6. Ressuspender o precipitado em 300 µl de tampão de lise de leucócitos, adicionar 5 µl de Proteinase K(10 mg/ml) e deixar pelo menos 1 hora a 65°C e mais 3 horas a 37°C (preferencialmente à noite).
7. Aquecer a 94°C por 10 minutos para inativar a proteinase K, estocar a -20°C. Este DNA tem se demonstrado de ótima qualidade para PCR.
 - a) Acrescentar 75 µl de NaCl 5,6 M autoclavado aos 300 µl de tampão de leucócitos;
 - b) Inverter cuidadosamente várias vezes;
 - c) Centrifugar durante 5 minutos a 6000 rpm;
 - d) Transferir o sobrenadante para outro eppendorf de 1,5 ml;
 - e) Adicionar a este sobrenadante transferido 900 µl de etanol 95% gelado (de preferência a -20°C);
 - f) Agitar cuidadosamente o tubo e deixar por no mínimo 2 horas em *freezer* a -20°C;
 - g) Centrifugar durante 5 minutos a 6000 rpm;
 - h) Descartar o sobrenadante, deixando aproximadamente 30 µl no tubo e cuidando para não ressuspender o *pellet*;
 - i) Adicionar 1ml de etanol 70% e inverter cuidadosamente;
 - j) Centrifugar durante 5 minutos a 6000 rpm;
 - k) Descartar o sobrenadante, deixando aproximadamente 30 µl no tubo cuidando para não ressuspender o *pellet*;
 - l) Secar a 37°C na estufa a vácuo;
 - m) Ressuspender o pellet em 200 µl de Tris-HCl pH 7,6 0,01 M;
 - n) Estocar a -20°C até o momento do uso. Existe indicação, de que o DNA em tampão, mantém-se por bastante tempo (1 ano ou mais) em geladeira; em freezer, mantém-se por tempo indeterminado.

Anexo IV – Manuscrito

O manuscrito apresentado foi derivado de parte dos dados desta Tese, e é requisito parcial à obtenção do Título de Doutor pelo Programa Pós-Graduação em Biologia Experimental.



Distribution of the CCR5delta32 allele (gene variant CCR5) in Rondônia, Western Amazonian region, Brazil

Josilcide Duarte de Farias^{1,2}, Marlene Guimarães Santos^{1,2}, Andonai Krauze de França², Daniel Delani², Mauro Shugiro Tada³, Almeida Andrade Casseb², Aguinaldo Luiz Simões⁴ and Vera Engracia^{1,2}

¹Laboratório de Genética Humana, Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais, Porto Velho, RO, Brazil.

²Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil.

³Serviços em Saúde Pública, Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, Porto Velho, RO, Brazil.

⁴Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Abstract

Since around 1723, on the occasion of its initial colonization by Europeans, Rondonia has received successive waves of immigrants. This has been further swelled by individuals from northeastern Brazil, who began entering at the beginning of the twentieth century. The ethnic composition varies across the state according to the various sites of settlement of each wave of immigrants. We analyzed the frequency of the CCR5Δ32 allele of the CCR5 chemokine receptor, which is considered a Caucasian marker, in five sample sets from the population. Four were collected in Porto Velho, the state capital and the site of several waves of migration. Of these, two, from the Hospital de Base were comprised of HB Mothers and HB Newborns presenting allele frequencies of 3.5% and 3.1%, respectively, a third from the peri-urban neighborhoods of Candelária/Bate-Estaca (1.8%), whereas a fourth, from the Research Center on Tropical Medicine/CEPEM (0.6%), was composed of malaria patients under treatment. The fifth sample (3.4%) came from the inland Quilombola village of Pedras Negras. Two homozygous individuals (CCR5Δ32/CCR5Δ32) were detected among the HB Mother samples. The frequency of this allele was heterogeneous and higher where the European inflow was more pronounced. The presence of the allele in Pedras Negras revealed European miscegenation in a community largely comprising Quilombolas.

Key words: CCR5, CCR5Δ32, Rondônia, genetic polymorphism, allele frequency.

Received: June 7, 2011; Accepted: September 30, 2011.

Introduction

In Brazil, the contribution of genes of Amerindian, African and European origin to the population has assumed various different patterns in the Amazonian Region, to the point that, in the State of Rondônia, migration became a significant factor in the diversification of ethnic composition. The initial colonization through a succession of emigrational waves was maintained, during the 1970's, when the capital, Porto Velho, and the nearby regions received numerous workers, natives of the southern and southeastern regions, as well as individuals descended from Italians, Germans and other nationalities, this intense gene flow giving rise to a tri-ethnic population pattern (Ferreira *et al.*, 2002).

The CCR5Δ32 allele appears to have originated quite recently (approximately 7,000 years ago) in northeastern

Europe (Lidén *et al.*, 2006). Although its frequency has now reached a relatively high level in Europeans, *e.g.*, 16.3% in Finns and 15.8% in Moravians, it is not present among African populations, and is only so at low levels in the Asian (Martinson *et al.*, 1997). Hence, by application it is possible to evaluate the influence of the European population on the genetic constitution of others.

According to Passos and Picanço (1998), in Brazil, its distribution varies in accordance to geographical location and ethnicity, *i.e.*, 3.5% in the urban population of southeastern Brazil and 0% in Amerindians. Imbalances in the geographical distribution of the CCR5Δ32 allele might either enable certain populations to show better adaptive responses to a series of environmental threats (Galvani and Novembre, 2005) or, on the contrary, be a risk factor in the development of a number of infections (Vargas *et al.*, 2009). According to Faure and Royer-Carenzi (2008), the distribution of this allele would depend on various genetic and/or environmental factors, such as the pathogen nature, thus resulting in an advantageous or disadvantageous relationship to the host.

Send correspondence to Vera Engracia. Laboratório de Genética Humana, Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais, Porto Velho, Rua da Beira 7671, Rodovia BR 364, km 3.5, 76812-245 Porto Velho, RO, Brazil. E-mail: engracia.oliveira@uol.com.br.

Other genetic polymorphisms that occur in the CCR5 gene have also been described, viz., A29S, L55Q and R60S, which may be associated with HIV-1 infection (Howard *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2009; Hütter and Ganepola, 2011). According to Sullivan *et al.* (2001), the presence of the CCR5Δ32 allele in a population could possibly influence the epidemiological trends of HIV infection, since the prevalence of HIV/AIDS is higher in populations that present low CCR5Δ32 allele frequency compared with those with a high frequency of homozygous or heterozygous individuals.

According to data from the Health Secretariat of Rondônia, there was a rise of 11.8% in the incidence of AIDS between 1997 (5.8%) and 2009 (17.6%), given a margin of 100,000 inhabitants. Consequently, the objective here was to determine CCR5Δ32 allele frequency in certain localities with different settlement backgrounds. The presence of Caucasian genes was predicted to reflect the gene flow coming from historical migration waves.

Materials and Methods

Populations and areas of study

The study was carried out with samples collected in two regions of Rondônia, the city of Porto Velho (63°54'14" W; 08°45'43" S) and the rural village of Pedras Negras (62°54' O; 12°51' S). The first three were from Porto Velho, one from the city's riverine region and the remainder from other locations. The fourth subsample was collected in the rural region of the state in the village of Pedras Negras, situated in the Guapore River valley. A map of the region is presented in Figure 1.

a. Samples from the region of Porto Velho

HB: The HB samples, collected between March and April, 2005, at the maternity Hospital de Base (HB) Dr. Ary Pinheiro, the main public hospital in the State of Rondônia,

comprised 310 mothers (HB Mothers) and 305 newborns (HB Newborns). For statistical analysis, they were considered as two independent sub-samples. The mothers were from various locations in Porto Velho or the neighboring towns.

CBE: This sample, consisting of specimens stored in the Laboratory of Human Genetics of the Research Institute on Tropical Pathologies (IPEPATRO), had been collected during 2001 and 2002 by some of the authors and a group of physicians and paramedics of the Research Center on Tropical Medicine (CEPEM), linked to the Health Department of the State of Rondônia. The 111 individuals, from two riverine neighborhoods of Porto Velho, Candelária (83) and Bate-Estaca (28), were unrelated, and descended from Barbadian, European and Brazilian workers from the country's northeastern region, who had migrated to Porto Velho during the beginning of the twentieth century.

CEPEM: This sample was composed of 84 unrelated individuals from the general population of Porto Velho (diagnosis and treatment) in 2001 and 2003.

b. Sample from the Guapore Valley region

This subsample, composed of 29 unrelated individuals from the village of Pedras Negras, were descendants of the Quilombo, a traditional Afro-Brazilian community. Material collection was undertaken in 2002 by a group of researchers from IPEPATRO and physicians working for the State of Rondônia in the town of Costa Marques (near Pedras Negras).

Blood collection

After obtaining written consent, 5 mL of peripheral blood were collected in EDTA vacutainer tubes. In the case of newborns from the Base Hospital, blood was collected from the umbilical cord, transported in refrigerated containers to the Laboratory of Human Genetics of the IPEPATRO, and processed within 10 h of leukocyte collection. All the samples were stored in aliquots at -20° until further use.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from leukocytes using 300 µL of peripheral blood according to the protocol described by Higuchi (1989).

Detection of the CCR5 polymorphism

CCR5 genotyping was performed by PCR using specific primers (CCR5Forward: 5' - GGCTTCATTACAC CTGC - 3' and CCR5Reverse: 5' - AGGATTCCCGAG TAGCAGATG - 3') and the protocol described by Chies and Hutz (2003). PCR reactions were prepared in a final volume of 25 µL as follows: 3 µL of genomic DNA, 2.5 µL of 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 2.5 µL of a 200 µM dNTP mix, 1.5 µL of 50 mM MgCl₂, 0.14 µL of each primer at 0.25 µM and 0.15 µL of

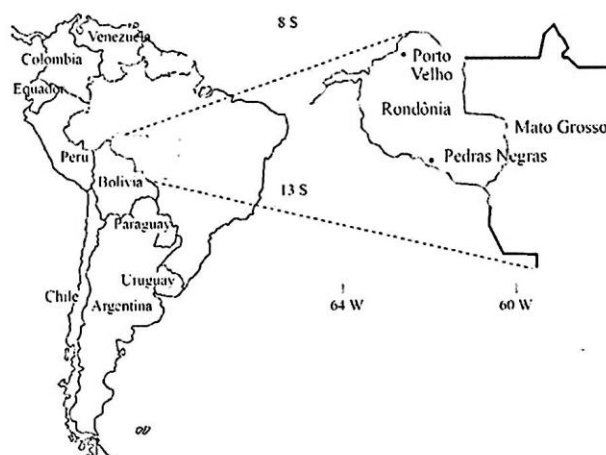


Figure 1 - Map of Brazil indicating the geographical location of the city of Porto Velho and that of the village of Pedras Negras.

Taq DNA polymerase (5 U/μL; Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA). The conditions for thermocycling were: 1 cycle of 5 min at 94 °C, 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 63 °C and 1 min at 72 °C, followed by a 10 min final extension at 72 °C (Eppendorf Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The PCR amplification products were subjected to electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel (100 V, 1 h 30') and stained with 10% silver nitrate. The CCR5/CCR5 genotype was detected as a single band of 137 base pairs (bp), the CCR5/CCR5Δ32 heterozygous genotype as a band of 137 bp plus another of 105 bp, and the CCR5Δ32/CCR5Δ32 homozygous genotype as a single band of 105 bp.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GENEPOP 4.0 (Rousset, 2008) and SPSS 19.0 Programs. Allele frequencies were obtained by maximum likelihood, and adherence to Hardy-Weinberg equilibrium tested by the chi-square test. 95% confidence intervals were calculated. A first attempt to estimate the degree of racial mixing in the present study-population, undertaken with only two of the sample groups, viz., parturient women (HB Mothers) and newborns (HB Newborns), was obtained using the ADMIX95 software developed by Chakraborty (1985). The genetic systems, previously validated in the same two sample groups, and their associated parental frequencies, were CCR5, CYP2E1 (cytochrome P450, subfamily IIE, polypeptide 1), GSTP1 (glutathione S-transferase class Pi) and ACP1 (acid phosphatase of low molecular weight).

Ethic procedures

This research was approved by the Brazilian Council of Research Ethics (CONEP, Number 13356).

Results and Discussion

The distribution frequencies of the CCR5Δ32 allele in the samples from Porto Velho and Pedras Negras, two towns located in the State of Rondônia (Table 1), were heterogeneous and reflected the settlement history of Rondônia

(Pinto, 1993), with higher frequencies in locales where the European flow was more intense (Teixeira and Ribeiro da Fonseca, 1998).

Ethnicity in the two samples from the Hospital de Base was predominantly African (64 and 65% for the HB Mothers and HB Newborns, respectively). In these samples, the Δ32 allele frequency was 0.035 ± 0.153 ($p = 0.0477$; $\chi^2 = 7.136$) among mothers and 0.031 ± 0.030 ($p > 0.05$; $\chi^2 = 0.315$) among newborns. Although the European contribution was higher in the filial than the maternal generation (17% vs. 5.9% Caucasian genotypes, respectively), two women homozygous for Δ32 were detected among the mothers. The first Brazilian report of individuals homozygous for the CCR5Δ32 allele was provided by Grimaldi *et al.* (2002), who, while investigating the occurrence of this allele in various ethnic groups from various regions, observed that its frequency varied according to ethnicity. Anthropogenetic data, collected in the interviews prior to blood collection, indicated that the HB sample was composed of individuals, who were either natives of other regions of the country or of other northern states (24.5% of the sample). Approximately 7.94% of the individuals in the study were from the northeastern region. Contributions from the other regions (midwestern, southern and southeastern) were lower.

The lowest CCR5Δ32 allele frequency of 0.0006 ± 0.000 ($p > 0.05$; $\chi^2 = 0.003$) was observed in the Porto Velho CEPEN subsample, with only one individual bearer. The Porto Velho riverine subsample (represented in this study by CBE) was comprised of individuals from the first emigration movements, mainly Barbadians and individuals from the northeast. While CCR5Δ32 allele frequency in this population was 0.018 ± 0.013 ($p > 0.05$; $\chi^2 = 0.037$), the allele itself was only observed in the heterozygous state. This low frequency could be expected, given the background of settlement by Negroid populations and miscegenation with the Amerindian people, present during the first colonization movements along the Madeira River (Ferreira, 1987). Pedras Negras, located in the southern

Table 1 - Genotypic distribution and gene frequencies of the CCR5 allele in different population samples of Porto Velho and of the village of Pedras Negras - Rondônia, Brazil.

Samples	Alleles and frequency						
	² WT/WT	WT/Δ32	Δ32/Δ32	Δ32 allele	χ^2	(p-value)	Standard deviation
^{HB} Mothers	290	18	02	0.035	7.136	0.0477	0.153
^{HB} Newborns	286	19	0	0.031	0.315	$P > 0.05$	0.030
¹ CBE	107	04	0	0.018	0.037	$P > 0.05$	0.013
Pedras Negras	27	02	0	0.034	0.037	$P > 0.05$	0.018
CEPEN	83	01	0	0.006	0.003	$P > 0.05$	0.000
Total	793	44	02	0.025	-	-	-

¹Villages of Candelária and Bate Estaca. ²WT; Wild type.

Guapore Valley (midwestern Rondônia), was originally populated by the descendants of slaves who had escaped from gold mining operations in the former capital of the State of Mato Grosso, between 1734 and 1835, thus having arrived in the Guapore Valley at least 200 years ago. This is the only region in Rondônia with a population that was originally Quilombolan (Teixeira MAD, 2004, PhD Thesis, Universidade Federal do Pará, Belém). The current inhabitants are mostly descendants of the union between Negroids and Caucasians, although the population also features a maternal native-Amerindian heritage. The observed frequency of the $\Delta 32$ allele in this group was 0.034 ± 0.018 ($p > 0.05$; $\chi^2 = 0.037$).

Allele frequencies, similar to those found in the Rondonian samples, have been detected in other Brazilian regions, *i.e.*, 0.6% in Cepem, 0.7% in African-Brazilian populations from Pará (Carvalho *et al.*, 2004), 0.9 and 1.0% in Bahia (Carvalho *et al.*, 2004), 1.8% in Candelária and Bate-Estaca and 1.9% and 2.0% in African-Brazilian individuals in Rio de Janeiro (Chies and Hutz, 2003) and Paraná (Boldt *et al.*, 2009), respectively. Among HIV⁺ subjects, frequencies ranged from 2.1% in Rio de Janeiro (Teixeira *et al.*, 2009) to 2.4% in Rio Grande do Sul (Vicira *et al.*, 2011), 2.6% in a miscegenated population in Bahia (Grimaldi *et al.*, 2002) and 3.8% in São Paulo (Rigato *et al.*, 2008). Hünemeier *et al.* (2005) found frequencies of 2.0 and 3.0% in Amerindian populations from south Brazil. Boldt *et al.* (2009) observed frequencies of at least 0.9% in Amerindians from the state of Paraná. The presence of the $\Delta 32$ allele in Amerindian populations is an indication of historical European miscegenation. The frequencies detected in our samples (3.1% in the HB Newborns, 3.4% among the Quilombolas of Pedras Negras and 3.5% of the HB Mothers sample) were similar to those found in an urban population of Belém (3.0%; Carvalho *et al.*, 2004), an urban population of Ribeirão Preto, São Paulo (3.5%) and a mixed population in Alegrete, RS (3.8%). However, our frequencies were lower than the 4.4% observed in the Euro-Brazilian population of Porto Alegre, and the 4.7% and 5.8% of patients with sickle-cell anemia, thus of African descent, from Recife and Porto Alegre (RS), respectively (Chies and Hutz, 2003). Brazilian populations described as Afro-Brazilian presented allele frequencies of 5.6% in the state of Bahia (Carvalho *et al.*, 2004) and 8.0% in the state of Rio Grande do Sul. The populations described as Euro-Brazilians generally presented the highest frequencies in the southern states: 6.5% in Joinville, State of Santa Catarina; 6.5% in Alegrete, State of Rio Grande do Sul; and 9.3% in the State of Paraná (Grimaldi *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2006; Boldt *et al.*, 2009, respectively).

Sullivan *et al.*, (2001) noted that the heterozygous presence of the mutant CCR5 allele can influence HIV epidemiological trends within a population, possibly through limiting the epidemic by reducing the likelihood of viral transmission by infected heterozygous individuals. In

2009, out of 150 HIV tests administered in the Vale do Guaporé, 80 proved to be positive. According to the state's health department, the northern region of Brazil (which includes Rondônia) exhibited a 39.6% increase in AIDS cases from 2002 to 2006. This high regional incidence incited us to analyze the $\Delta 32$ allele, which is of European origin (Faure and Royer-Carenzi, 2008), in a population of Quilombolan descendants, although without investigating the relationship between CCR5 $\Delta 32$ and AIDS. Notwithstanding, future studies in this region should thus address this issue, given the high incidence of HIV infection.

In conclusion, the European heritage of the individuals comprising the current population of Rondônia was reflected in our observation of the CCR5 $\Delta 32$ allele in the Quilombolan population of the Guapore Valley, the ethnically heterogeneous mothers from the Hospital de Base of Porto Velho, and individuals from Candelária and Bate-Estaca, where the current population is descended from Negroid immigrants and native Amerindians.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Amado Ahamad Rahhal for authorizing collection within the Hospital de Base of Porto Velho, Rondônia, as well as MSc Joana D'Arc Neves Costa for access to CEPEN samples of malaria patients. We would also like to acknowledge all of the subjects who agreed to take part in the study. This work was supported by IPEPATRO, Fiocruz and FNS.

References

- Boldt ABW, Culpi L, Tsuneto LT, Souza IR, Kun JFJ and Petzl-Erler ML (2009) Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindian and high CCR5 $\Delta 32$ frequency in Euro-Brazilians. *Genet Mol Biol* 32:12-14.
- Carvalho FAPL, Cardoso GL, Hamoy IG and Guerreiro JF (2004) Distribution of CCR5- $\Delta 32$, CCR2-64I, SDF1-3'A mutations in populations from the Brazilian Amazon region. *Hum Biol* 76:643-646.
- Carvalho MWP, Leboutte APM, Oliveira SF, Sousa SMB, Klautau-Guimarães MN and Simões AL (2004) CCR5 $\Delta 32$ mutation in three Brazilian populations of predominantly Sub-Saharan African ancestry. *Genet Mol Biol* 27:321-325.
- Chakraborty R (1985) A note on the calculation of random RP and its sampling variance. *Hum Biol* 57:713-717.
- Chies JAB and Hutz MH (2003) High frequency of the CCR5 $\Delta 32$ variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 36:71-75.
- Faure E and Royer-Carenzi M (2008) Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-Delta32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion? *Infect Genet Evol* 8:864-874.
- Ferreira MR (1987) A Ferrovia do Diabo. Editora Melhoramentos, São Paulo, 408 pp.

CCR5 allele in Rondônia, Brazil

- Ferreira RGM, Moura MM, Engracia V, Pagotto RC, Alves FP, Camargo LMA, Pereira da Silva LH, Camargo EP, Beiguelman B and Krieger H (2002) Ethnic admixture composition of two western Amazonian populations. *Hum Biol* 74:607-613.
- Galvani AP and Novembre J (2005) The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-resistance mutation. *Microbes Infect* 7:302-309.
- Grimaldi R, Shindo N, Acosta AX, Dourado I, Brites C, de Melo Carvalho O, Brito I, Bou-Habib DC and Galvao-Castro B (2002) Prevalence of the CCR5Δ 32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. *Hum Genet* 111:102-104.
- Higuchi R (1989) Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich HA (ed) *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, New York, pp 31-38.
- Howard OM, Shirakawa AK, Turpin JA, Maynard A, Tobin GJ, Carrington M, Oppenheim JJ and Dean M (1999) Naturally occurring CCR5 extracellular and transmembrane domain variants affect HIV-1 Co-receptor and ligand binding function. *J Biol Chem* 274:16228-16234.
- Hünemeier T, Neves AG, Normberg I, Hill K, Hurtado AM, Carnese FR, Goicoechea AS, Hutz MH, Salzano FM and Chies JA (2005) T-cell and chemokine receptor variation in South Amerindian populations. *Am J Hum Biol* 17:515-518.
- Hütter G and Ganepola S (2011) The CCR5-delta32 polymorphism as a model to study host adaptation against infectious diseases and to develop new treatment strategies. *Exp Biol Med* 236:938-943.
- Lidén K, Linderholm A and Götherström A (2006) Pushing it back. Dating the CCR5-D32 bp deletion to the Mesolithic in Sweden and its implications for the Meso/Neo transition. *Doc Praehist* 33:29-37.
- Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT and Clegg JB (1997) Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 16:100-103.
- Passos GAS and Picanço VP (1998) Frequency of the ΔCCR5 deletion allele in the urban Brazilian population. *Immun Lett* 61:205-207.
- Pinto EP (1993) Rondônia, Evolução Histórica: Criação do Território Federal de Guaporé, Fator de Integração Nacional. Editora Expressão e Cultura, Rio de Janeiro, 216 pp.
- Rigato PO, Hong MA, Casseb J, Ueda M, de Castro I, Benard G and Duarte AJ (2008) Better CD4⁺ T cell recovery in Brazilian HIV-infected individuals under HAART due to cumulative carriage of SDF-1-3'A, CCR2-V64I, CCR5-D32 and CCR5-promoter 59029A/G polymorphisms. *Curr HIV Res* 6:466-473.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 8:103-106.
- Sullivan AD, Wigginton J and Kirschner D (2001) The coreceptor mutation CCR532 influences the dynamics of HIV epidemics and is selected for by HIV. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10214-10219.
- Teixeira MAD and Ribeiro da Fonseca D (1998) História Regional (Rondônia). ABG Gráfica Editora, Porto Velho, 241 pp.
- Teixeira SLM, Bastos FI, Hacker MA and Morgado MG (2009) Distribution of CCR5 genotypes and HLA Class I B alleles in HIV-1 infected and uninfected injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol* 9:638-642.
- Vargas AE, Marreno AR, Salzano FM, Bortolini MC and Chies JAB (2006) Frequency of CCR532 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 39:321-325.
- Vargas AE, Cechim G, Correa JF, Gomes PA, Macedo GS, Medeiros RM, Perotoni G, Rauber R, Villodre ES and Chies JAB (2009) Pros and cons of a missing chemokine receptor - comments on "Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-D32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?" by Eric Faure and Manuela Royer-Carenzi (2008). *Infect Genet Evol* 9:387-389.
- Vieira VC, Barral MF, Mendoza-Sassi RA, Silveira JM, Soares MA and Martinez AM (2011) The effect of combined polymorphisms in chemokines and chemokine receptors on the clinical course of HIV-1 infection in a Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106:408-414.

Associate Editor: Mara Hutz

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.